

06

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

(11) Publication number:

(11) Numéro de publication:

**EP 1 507 795 A0**

Internationale Anmeldung veröffentlicht durch die  
Weltorganisation für geistiges Eigentum unter der Nummer:

**WO 03/102023** (art. 158 des EPÜ).

International application published by the World  
Intellectual Property Organisation under number:

**WO 03/102023** (art. 158 of the EPC).

Demande internationale publiée par l'Organisation  
Mondiale de la Propriété sous le numéro:

**WO 03/102023** (art. 158 de la CBE).



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
11. Dezember 2003 (11.12.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 03/102023 A1

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C07K 7/06,  
16/00, C12N 15/00, A61K 38/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/03181

(22) Internationales Anmeldedatum:  
27. März 2003 (27.03.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 25 144.4 29. Mai 2002 (29.05.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH  
[DE/DE]; Auf der Morgenstelle 15, 72076 Tübingen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WEINSCHENK, Toni  
[DE/DE]; Plochingenstrasse 146, 73730 Esslingen (DE).  
RAMMENSEE, Hans, Georg [DE/DE]; Sommerhalde  
3, 72070 Tübingen-Unterjessingen (DE). STEVANOVIC,  
Stefan [DE/DE]; Auf der Burg 3, 72074 Tübingen (DE).

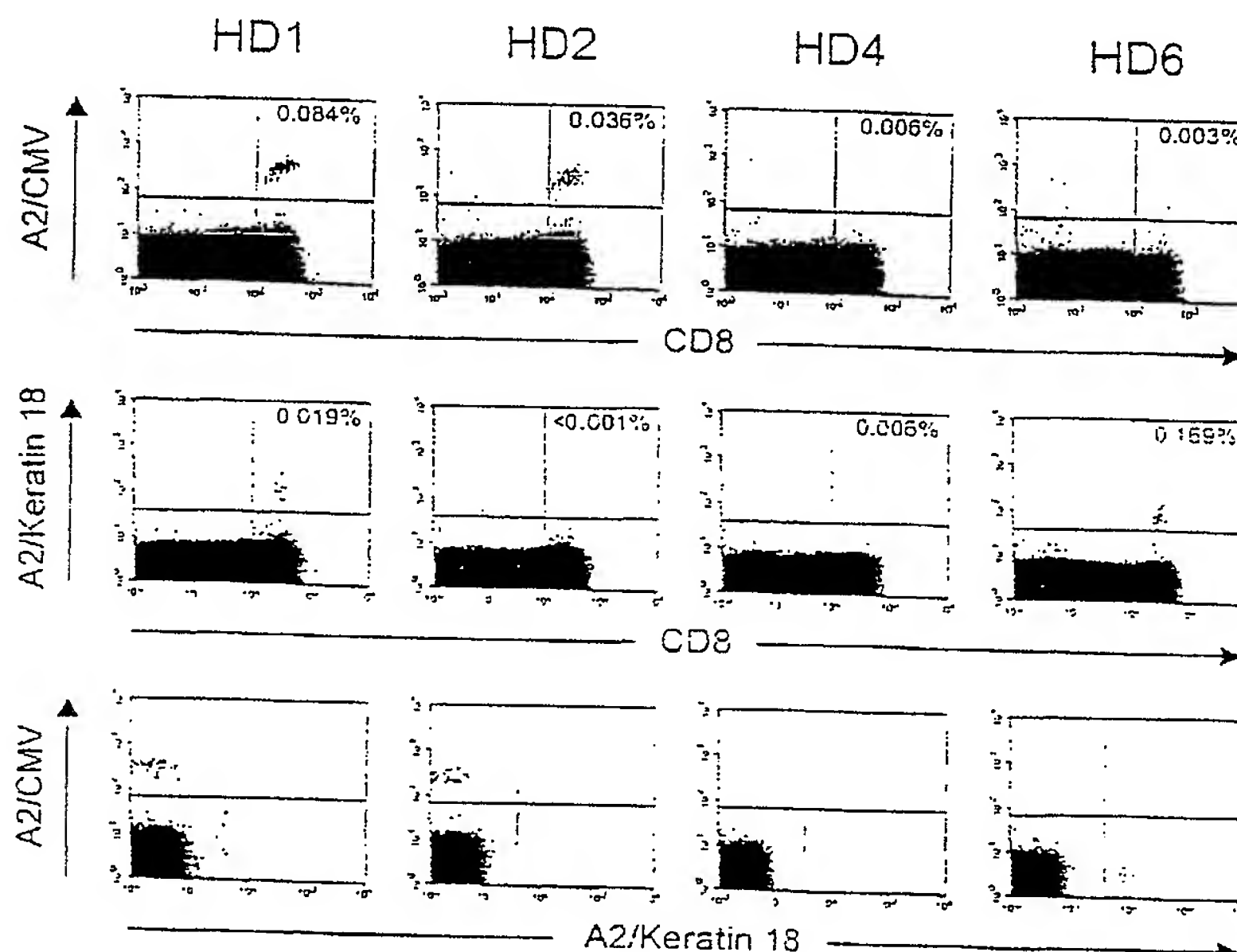
(74) Anwälte: OTTEN, H. usw.; Witte, Weller & Partner, Post-  
fach 105462, 70047 Stuttgart (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO,  
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,  
UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: TUMOUR-ASSOCIATED PEPTIDES THAT BOND TO MHC MOLECULES

(54) Bezeichnung: AN MHC-MOLEKÜLE BINDENDE TUMOR-ASSOZIIERTE PEPTIDE



(57) Abstract: The invention relates to a tumour-associated peptide containing an amino acid sequence, which is selected from the group consisting of SEQ ID No. 1 to SEQ ID No. 79 of the enclosed sequence protocol. Said peptide has the capacity to bond to a molecule of the human major histocompatibility complex (MHC) class I. The invention also relates to the use of the peptides for producing a medicament and for treating tumorous diseases. The invention further relates to a pharmaceutical composition, which comprises at least one of the peptides.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 03/102023 A1



(84) **Bestimmungsstaaten** (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Tumor-assoziiertes Peptid mit einer Aminosäuresequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID-Nr. 1 bis SEQ ID-Nr. 79 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll, wobei das Peptid die Fähigkeit aufweist, an ein Molekül des menschlichen Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexes (MHC) Klasse-I zu binden. Die Erfindung betrifft darüber hinaus die Verwendung der Peptide zur Herstellung eines Arzneimittels und zur Behandlung von Tumorerkrankungen. Ferner wird eine pharmazeutische Zusammensetzung beschrieben, die mindestens eines der Peptide aufweist.

An MHC-Moleküle bindende Tumor-assoziierte Peptide

Die vorliegende Erfindung betrifft Tumor-assoziierte Peptide, die die Fähigkeit aufweisen, an ein Molekül des menschlichen Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexes (MHC), Klasse I, zu binden.

Derartige Peptide werden bspw. in der Immuntherapie von Tumorerkrankungen eingesetzt.

Bei der Eliminierung von Tumorzellen durch das Immunsystem spielt die Erkennung von Tumor-assoziierten Antigenen (TAA)

durch Komponenten des Immunsystems eine herausragende Rolle. Diesem Mechanismus liegt die Voraussetzung zugrunde, dass zwischen Tumorzellen und normalen Zellen qualitative oder quantitative Unterschiede bestehen. Um eine anti-Tumor-Antwort herbeizuführen, müssen die Tumorzellen Antigene exprimieren, gegen welche eine immunologische Antwort erfolgt, die für die Eliminierung des Tumors ausreicht.

Beteiligt bei der Abstoßung von Tumoren sind insbesondere CD8-exprimierende zytotoxische T-Lymphozyten (im folgenden CTL). Zur Auslösung einer derartigen Immunreaktion durch zytotoxische T-Zellen müssen den T-Zellen dazu fremde Proteine/Peptide präsentiert werden. T-Zellen erkennen Antigene als Peptidfragmente nur dann, wenn diese an Zelloberflächen von MHC-Molekülen präsentiert werden. Diese MHC-Moleküle ("major histocompatibility complex") sind Peptidrezeptoren, die normalerweise Peptide innerhalb der Zelle binden, um sie zu der Zelloberfläche zu transportieren. Dieser Komplex aus Peptid und MHC-Molekül kann durch die T-Zellen erkannt werden. Die MHC-Moleküle des Menschen werden auch als humane Leukozyten-Antigene (HLA) bezeichnet.

Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen: MHC-Klasse-I-Moleküle, die auf den meisten Zellen mit Kern vorkommen, präsentieren Peptide, die durch proteolytischen Abbau endogener Proteine entstehen. MHC-Klasse-II-Moleküle kommen nur auf professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) vor und präsentieren Peptide exogener Proteine, die im Verlauf der Endozytose von APC aufgenommen und verarbeitet werden. Komplexe aus Peptid und MHC-Klasse-I werden von CD8-positiven zytotoxischen T-

Lymphozyten erkannt, Komplexe aus Peptid und MHC-Klasse-II werden von CD4-Helfer-T-Zellen erkannt.

Damit ein Peptid eine zelluläre Immunantwort auslösen kann, muss es an ein MHC-Molekül binden. Dieser Vorgang ist vom Allel des MHC-Moleküls und von der Aminosäuresequenz des Peptids abhängig. MHC-Klasse-I-bindende Peptide sind in der Regel 8-10 Reste lang und enthalten in ihrer Sequenz zwei konservierte Reste ("Anker"), die mit der entsprechenden Bindungsfurche des MHC-Moleküls interagieren.

Damit das Immunsystem eine effektive CTL-Antwort gegen Tumor-abgeleitete Peptide starten kann, müssen diese Peptide nicht nur in der Lage sein, an die bestimmten MHC-Klasse-I-Moleküle zu binden, die von den Tumorzellen exprimiert werden, sondern sie müssen auch von T-Zellen mit spezifischen T-Zell-Rezeptoren (TCR, „T-cell receptor“) erkannt werden.

Das Hauptziel zur Entwicklung einer Tumorstoffimpfung ist die Identifizierung und Charakterisierung von Tumor-assoziierten Antigenen, die durch CD8<sup>+</sup> CTL erkannt werden.

Die Antigene, die von den Tumor-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt werden, bzw. deren Epitope, können Moleküle aus sämtlichen Proteinklassen sein, wie z.B. Enzyme, Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren, etc. Eine andere wichtige Klasse Tumor-assoziiierter Antigene sind Gewebe-spezifische Strukturen, wie bspw. CT ("cancer testis")-Antigene, die in verschiedenen Tumorarten und in gesundem Hodengewebe exprimiert werden.



Damit die Proteine durch die zytotoxischen T-Lymphozyten als Tumor-spezifisches Antigen erkannt werden, und um somit in einer Therapie eingesetzt werden zu können, müssen bestimmte Voraussetzungen vorliegen: Das Antigen soll hauptsächlich von Tumorzellen exprimiert werden und von Normalgeweben nicht oder nur in geringeren Mengen als in den Tumoren. Weiterhin ist wünschenswert, wenn das betreffende Antigen nicht nur in einer Tumorart, sondern auch in weiteren in hoher Konzentration vorliegt. Unbedingt essentiell ist auch das Vorliegen von Epitopen in der Aminosäuresequenz des Antigens, da solche von einem Tumor-assoziierten Antigen abgeleiteten Peptide ("immunogene Peptide") zu einer T-Zell-Antwort führen sollen, sei es *in vitro* oder *in vivo*.

TAAAs stellen somit ein Ausgangspunkt für die Entwicklung einer Tumorstoffvakzine dar. Die Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung der TAA beruhen zum einen auf dem Einsatz von in Patienten bereits induzierten CTL oder basieren auf der Erstellung differentieller Transkriptionsprofile zwischen Tumoren und Normalgeweben.

Das Auffinden von Genen, die in Tumorgeweben überexprimiert sind, oder die in derartigen Geweben selektiv exprimiert werden, liefert jedoch keine präzise Information für einen Einsatz der von diesen Genen transkribierten Antigene in der Immuntherapie. Dies hat die Ursache darin, dass jeweils nur einzelne Epitope dieser Antigene für einen derartigen Einsatz geeignet sind, da nur die Epitope der Antigene - nicht das gesamte Antigen - durch MHC-Präsentierung eine T-Zell-Antwort hervorrufen. Daher ist es wichtig, diejenigen Peptide von überexprimierten oder selektiv exprimierten Proteinen zu selektieren, die mit



MHC-Molekülen präsentiert werden, wodurch Angriffspunkte für die spezifische Tumorerkennung durch zytotoxische T-Lymphozyten gewonnen werden könnten.

Vor diesem Hintergrund ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, mindestens eine neue Aminosäuresequenz für ein derartiges Peptid bereitzustellen, welches die Fähigkeit aufweist, an ein Molekül des menschlichen Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexes (MHC)-Klasse-I zu binden.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Bereitstellung eines Tumor-assoziierten Peptids mit einer Aminosäuresequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID-Nr. 1 bis SEQ ID-Nr. 79 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll, wobei das Peptid die Fähigkeit aufweist, an ein Molekül des menschlichen Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexes (MHC) Klasse-I zu binden.

Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe wird auf diese Weise vollkommen gelöst.

Dabei versteht sich, dass die vom Tumor identifizierten Peptide zur Gewinnung größerer Mengen und zum Einsatz bei den unten aufgeführten Zwecken synthetisiert oder in Zellen zur Expression gebracht werden.

Die Erfinder konnten die obengenannten Peptide als spezifische Liganden von MHC-Klasse-I-Molekülen aus Tumorgewebe isolieren und identifizieren. Dabei werden hierin mit dem Begriff "Tumor-assoziiert" Peptide bezeichnet, die aus Tumormaterial isoliert und identifiziert wurden. Diese Peptide, die auf echten (primä-

ren) Tumoren präsentiert werden, unterliegen also der Antigenprozessierung in einer Tumor-Zelle.

Die spezifischen Liganden können in der Krebstherapie eingesetzt werden, z.B. um eine Immunantwort gegen Tumorzellen zu induzieren, die die entsprechenden Antigene exprimieren, von denen die Peptide abstammen.

Eine solche Immunantwort in Form einer Induktion von CTL kann zum einen *in vivo* erreicht werden. Dazu wird einem Patienten, der an einer mit dem TAA assoziierten Tumorerkrankung leidet, das Peptid bspw. in Form einer pharmazeutischen Zusammensetzung verabreicht.

Andererseits kann eine CTL-Antwort auf einen Tumor, der die Antigene, von denen die Peptide abstammen, exprimiert, auch *ex vivo* ausgelöst werden. Dazu inkubiert man die CTL-Vorläuferzellen zusammen mit Antigen-präsentierenden Zellen und den Peptiden. Anschließend kultiviert man die dadurch stimulierten CTL und verabreicht diese aktivierten CTL dem Patienten.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, APC *ex vivo* mit den Peptiden zu beladen und diese beladenen APC dem Patienten zu verabreichen, der im Tumorgewebe das Antigen exprimiert, von dem das Peptid abstammt. Die APC können dann wiederum *in vivo* den CTL das Peptid präsentieren und sie aktivieren.

Die erfindungsgemäßen Peptide können aber auch als diagnostische Reagenzien eingesetzt werden.

So kann mit den Peptiden herausgefunden werden, ob in einer CTL-Population spezifisch gegen ein Peptid gerichtete CTL vorliegen oder durch eine Therapie induziert wurden.

Außerdem kann mit den Peptiden die Zunahme von Vorläufer T-Zellen getestet werden, die eine Reaktivität gegen das definierte Peptid aufweisen.

Ferner kann das Peptid als Marker dazu verwendet werden, um den Krankheitsverlauf eines Tumors zu verfolgen, der das Antigen exprimiert, von dem das Peptid abstammt.

In der beigefügten Tabelle 1 sind die identifizierten Peptide aufgeführt. Dabei sind sie nach den jeweiligen HLA-Typen, an die sie binden, geordnet. In der Tabelle sind außerdem die Proteine angegeben, von denen das Peptid abstammt und die jeweilige Position des Peptids in dem betreffenden Protein. Dabei sind die englischen Bezeichnungen der Proteine beibehalten worden, um missverständliche Übersetzungen zu vermeiden. Ferner sind jeweils die Acc-Nummern angegeben, die in der Genbank des "National Center for Biotechnology Information" des National Institute of Health geführt werden (siehe <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Die Erfinder konnten die Peptide (oder Liganden) aus Nierenzelltumoren zweier Patienten, RCC01 und RCC13, isolieren. Dabei wurden 68 Liganden aus Tumorgewebe des Patienten RCC01 isoliert, 13 aus Tumorgewebe des Patienten RCC13. Zwei der in beiden Patienten identifizierten Liganden waren identisch. Dies waren die Peptide mit der SEQ ID-Nr. 1 und 3 (YVDPVITSI von met-Protoonkogen (C-Met) und ALLNIKVKL von Keratin 18).

Aus den Tumoren der Patienten konnten 79 Liganden identifiziert werden, von denen 30 an den HLA-Subtypen HLA-A\*02, 13 an HLA-A\*68, 34 an HLA-B\*18 oder HLA-B\*44 und 2 an HLA\*24 gebunden waren.

HLA-A\*02-Liganden wiesen alle das allel-spezifische Peptidmotiv auf: (Leucin/Valin, Isoleucin, Alanin oder Methionin an Position 2, Leucin/Valin, Isoleucin oder Alanin am C-Terminus).

Einige der Liganden stammten von stark exprimierten sogenannten "Housekeeping" Genen ab, die in den meisten Geweben gleichmäßig exprimiert werden, viele zeichneten sich aber durch Tumor-Assoziierung aus.

Bei dem Peptid mit der Sequenz ID-Nr. 1 YVDPVITSI handelt es sich z.B. um einen Liganden, der insbesondere mit Tumoren in Verbindung gebracht wird und der vom met-Protoonkogen (c-Met) (Position 654-662) abstammt. Die Peptide mit der Sequenz ID-Nr. 2, 22 und 23 stammen vom Adipophilin (auch als "Adipose differentiation related" Protein bezeichnet) ab und weisen die Positionen 129-137, 62-71 und 349-358 in diesem Protein auf, wobei die letzteren beiden zu den durch HLA-A\*68 präsentierten Peptiden zählten. Bei dem Liganden mit der Sequenz ID-Nr. 3 handelt es sich um einen Liganden, der von Keratin 18 herrührt und dort bei Position 365-373 lokalisiert ist.

Der größte Teil der Liganden wies an Position 2 die Aminosäure Glutaminsäure (E) auf, eine Anker-Aminosäure des HLA-B\*44-Subtyps. So konnten Peptide identifiziert werden, die von Proteinen abstammen, die sich bereits in früheren Versuchen als immunogen erwiesen haben, wie bspw. das Peptid mit der Sequenz

ID-Nr. 5, welches von dem Protein Annexin II abstammt (Position in Annexin II: 55-63). Dieses Protein erwies sich in bezug auf MHC Klasse II-Moleküle in Melanom-Patienten als immunogen (siehe Heinzel et al., The self peptide annexin II (208 - 223) presented by dendritic cells sensitizes autologous CD4+ T lymphocytes to recognize melanoma cells, 2001, Cancer Immunol. Immunother. 49:671-678).

Außerdem konnten einige Peptide identifiziert werden, die von Proteinen abstammen, die insbesondere in Tumorgewebe überexprimiert werden. So konnten Fragmente von Vimentin (EEIAFLKKL, Position 229-237) und Caldesmon (DEAAFLERL, Position 92-100) identifiziert werden. Young et al., Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers, 2001, Am. J. Pathol., 158:1639-1651) zeigten, dass diese Proteine in Gewebe von Nierenzelltumoren überexprimiert waren.

Die Erfinder konnten außerdem u.a. Liganden identifizieren, die von ets-1 (NEFSLKGVDF, Position 86-95), Alpha-Catenin (NEQDLGIQY, Position 169-177) und Galectin 2 (SEVKFTVTF, Position 80-88) abstammen.

Weiterhin isolierten die Erfinder das Fragment YYMIGEOKF (Sequenz ID-Nr. 79), welches von dem Enzym Nicotinamid-N-Methyltransferase abstammt (Position 203-211). Takahashi et al., Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: gene identification and prognostic classification, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:9754-9749, zeigten, dass dieses Enzym in Nierenzelltumorgewebe überexprimiert war.

Die Erfinder konnten überraschenderweise für eines der identifizierten Peptide spezifische zytotoxische T-Lymphozyten in Spenderblut nachweisen. Dadurch ist das Potential gegeben, um eine spezifische CTL-Antwort gegen die Tumoren zu triggern.

Ferner konnten die Erfinder in eigenen Versuchen zeigen, dass es unter Verwendung zweier beispielhaft ausgewählter Peptide möglich war, *in vitro* zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) zu generieren, die spezifisch für das Peptid mit der SEQ ID-Nr. 1 (c-Met-Protoonkogen-Fragment oder c-Met-Peptid) oder spezifisch für das Peptid mit der SEQ ID-Nr. 2 (Adipophilin-Fragment oder Adipophilin-Peptid) waren. Mit diesen CTL konnten gezielt Tumorzellen abgetötet werden, welche die entsprechenden Proteine exprimierten und welche darüber hinaus von verschiedenen Tumorzelllinien unterschiedlicher Patienten stammten. Die Erfinder konnten weiterhin zeigen, dass die genannten CTL auch bspw. dendritische Zellen lysierten, die zuvor mit den jeweiligen Peptiden "gepulst" (beladen) wurden. Durch diese Versuche konnten die Erfinder zeigen, dass mit den erfindungsgemäßen Peptiden als Epitope humane T-Zellen *in vitro* aktiviert werden konnten. Die Erfinder konnten demnach nicht nur zeigen, dass CTL, die aus peripheren Blut-mononukleären-Zellen (PBMNC) eines Patienten gewonnen wurden und die für ein bestimmtes Peptid spezifisch waren, Zellen der gleichen Tumorart eines anderen Patienten abtöten konnten. Die Erfinder zeigten außerdem, dass mit diesen CTL auch Zellen anderer Tumorarten lysiert werden konnten.

In einer bevorzugten Ausführungsform können auch Peptide zur Stimulierung einer Immunantwort eingesetzt werden, die die Sequenz ID-Nr. 1 bis 79 aufweisen und bei denen zumindest eine



Aminosäure durch eine andere Aminosäure mit ähnlichen chemischen Eigenschaften ersetzt ist.

Dies sind mit Bezug auf die jeweiligen MHC-Subtypen bspw. die Ankeraminosäuren, die durch Aminosäuren mit ähnlichen chemischen Eigenschaften ersetzt werden können. So kann bspw. bei Peptiden, die mit dem MHC-Subtyp HLA-A\*02 assoziiert sind, an Position 2 Leucin mit Isoleucin, Valin oder mit Methionin und umgekehrt ausgetauscht werden, und am C-Terminus Leucin mit Valin, Isoleucin und Alanin, die allesamt unpolare Seitenketten aufweisen.

Weiterhin ist es möglich, Peptide mit der Sequenz ID-Nr. 1 bis 79 einzusetzen, die N- oder/und C-terminal zumindest eine weitere Aminosäure aufweisen oder bei denen zumindest eine Aminosäure deletiert ist.

Weiterhin können Peptide mit der Sequenz ID-Nr. 1 bis 79 eingesetzt werden, bei denen zumindest eine Aminosäure chemisch modifiziert ist.

Die variierende(n) Aminosäure(n) ist(sind) dabei so gewählt, dass durch die Variation die Immunogenität des Peptids nicht beeinträchtigt ist, d.h. eine ähnliche Bindungsaffinität an das MHC-Molekül und die Fähigkeit zur T-Zell-Stimulierung aufweist.

Erfindungsgemäß kann das Peptid zur Behandlung von Tumorerkrankungen und/oder adenomatöser Erkrankungen verwendet werden.

Die zu behandelnden Tumorerkrankungen umfassen dabei bspw. Nieren-, Brust-, Pankreas-, Magen-, Hoden- und/oder Hautkrebs.



Die Aufzählung der Tumorerkrankungen ist dabei lediglich beispielhaft und soll den Verwendungsbereich nicht eingrenzen.

Dass die erfindungsgemäßen Peptide für eine solche Verwendung geeignet sind, konnten die Erfinder in eigenen Versuchen zeigen. Darin wurde nachgewiesen, dass eigens generierte CTL, die spezifisch für bestimmte Peptide waren, effektiv und selektiv Tumorzellen abtöten konnten.

Für einen Einsatz von Tumor-assoziierten Antigenen in einer Tumervakzine sind grundsätzlich mehrere Applikationsformen möglich. So beschrieben Tighe et al., 1998, Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint, Immunol. Today 19(2):89-97, dass das Antigen entweder als rekombinantes Protein mit geeigneten Adjuvantien bzw. Trägersystemen oder als die für das Antigen kodierende cDNA in Plasmidvektoren verabreicht werden kann. In diesen Fällen muss das Antigen im Körper des Patienten von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) verarbeitet und präsentiert werden, damit eine Immunantwort ausgelöst wird.

Melief et al., 1996, Peptide-based cancer vaccines, Curr. Opin. Immunol. 8:651-657, zeigen eine weitere Möglichkeit, nämlich die Verwendung von synthetischen Peptiden als Vakzine.

Das Peptid kann dabei in einer bevorzugten Ausführungsform mit Zugabe von Adjuvantien verwendet werden, oder aber auch in Alleinstellung.

Als Adjuvans kann bspw. der Granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor (GM-CSF) eingesetzt werden.

Weitere Beispiele für solche Adjuvantien sind Aluminiumhydroxid, Emulsionen von Mineralölen, wie bspw. das Freund'sche Adjuvans, Saponine oder Siliciumverbindungen.

Die Verwendung mit Adjuvantien bietet den Vorteil, dass die durch das Peptid ausgelöste Immunantwort verstärkt werden kann und/oder dass das Peptid stabilisiert wird.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird das Peptid gebunden auf einer Antigen-präsentierenden Zelle eingesetzt.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, dass die Peptide dem Immunsystem, insbesondere den zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL), präsentiert werden können. Dadurch können die CTL die Tumorzellen erkennen und spezifisch abtöten. Als Antigen-präsentierende Zellen sind bspw. dendritische Zellen, Monozyten oder B-Lymphozyten für einen solchen Einsatz geeignet.

Dabei werden die Zellen bspw. ex vivo mit den Peptiden beladen. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, die Zellen mit der für die Peptide kodierenden DNA oder der entsprechenden RNA zu transfizieren, um dann die Peptide auf den Zellen zur Expression zu bringen.

Die Erfinder konnten in eigenen Versuchen zeigen, dass es möglich ist, dendritische Zellen (DC) mit spezifischen Peptiden zu beladen, und dass diese beladenen dendritischen Zellen Peptidspezifische CTL aktivieren. Dies bedeutet, dass das Immunsystem stimuliert werden kann, CTL gegen die Tumore zu entwickeln, welche die entsprechenden Peptide exprimieren.

Die das Peptid tragenden Antigen-präsentierenden Zellen können dabei entweder direkt verwendet werden oder aber vor einem Einsatz bspw. mit dem Hitzeschock-Protein gp96 aktiviert werden. Dieses Hitzeschock-Protein induziert die Expression von MHC-Klasse I-Molekülen und von costimulierenden Molekülen wie B7 und stimuliert außerdem die Produktion von Zytokinen. Dadurch wird insgesamt die Auslösung von Immunantworten gefördert.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform werden die Peptide zur Markierung von Leukozyten, insbesondere von T-Lymphozyten verwendet.

Diese Verwendung ist von Vorteil, wenn mit den Peptiden herausgefunden werden soll, ob in einer CTL-Population spezifisch gegen ein Peptid gerichtete CTL vorliegen.

Ferner kann das Peptid als Marker zur Beurteilung eines Therapieverlaufes bei einer Tumorerkrankung verwendet werden.

Auch bei anderen Immunisierungen oder Therapien kann das Peptid für das Monitoring der Therapie eingesetzt werden. Somit ist das Peptid nicht nur therapeutisch, sondern auch diagnostisch einsetzbar.

In einer weiteren Ausführungsform werden die Peptide zur Herstellung eines Antikörpers eingesetzt.

Polyklonale Antikörper können in herkömmlicher Weise durch Immunisierung von Tieren mittels Injektion der Peptide und anschließender Reinigung des Immunglobulins gewonnen werden.

Monoklonale Antikörper können nach Standardprotokollen hergestellt werden, wie bspw. in Methods Enzymol. (1986), 121, Hybridoma technology and monoclonal antibodies, beschrieben.

Die Erfindung betrifft außerdem in einem weiteren Aspekt eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eines oder mehrere der Peptide enthält.

Diese Zusammensetzung dient bspw. der parenteralen Verabreichung, bspw. subkutan, intradermal oder intramuskulär, oder der oralen Verabreichung. Dabei sind die Peptide in einem pharmazeutisch annehmbaren, vorzugsweise wässrigen, Träger gelöst oder suspendiert. Darüber hinaus kann die Zusammensetzung Hilfsstoffe, wie bspw. Puffer, Bindemittel, Verdünnungsmittel, etc. enthalten.

Die Peptide können auch zusammen mit immunstimulierenden Substanzen, z.B. Zytokinen, verabreicht werden. Eine umfassende Darstellung von Hilfsstoffen, wie sie bei einer derartigen Zusammensetzung verwendet werden können, ist bspw. in A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3. Ed., 2000, American Pharmaceutical Association and pharmaceutical press, dargestellt.

Das Mittel kann dabei zur Prävention, Prophylaxe und/oder Therapie von Tumorerkrankungen und/oder adenomatöser Erkrankungen eingesetzt werden.

Das pharmazeutische Mittel, das zumindest eines der Peptide mit der Sequenz ID-Nr. 1 bis 79 enthält, wird einem Patienten verabreicht, der an einer Tumorerkrankung leidet, mit der das

betreffende Peptid bzw. Antigen assoziiert ist. Dadurch kann eine Tumor-spezifische Immunantwort auf Basis Tumor-spezifischer CTL ausgelöst werden.

Die in der pharmazeutischen Zusammensetzung vorliegende Menge des Peptids oder der Peptide liegt dabei in einer therapeutisch effektiven Menge vor. Dabei können die in der Zusammensetzung enthaltenen Peptide auch an mindestens zwei verschiedene HLA-Typen binden.

Die vorliegende Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt Nukleinsäuremoleküle, die für die Peptide mit der Sequenz ID-Nr. 1 bis 79 kodieren.

Die Nukleinsäuremoleküle können dabei DNA- oder RNA-Moleküle sein und ebenfalls für die Immuntherapie von Krebserkrankungen eingesetzt werden. Dabei induziert das von dem Nukleinsäuremolekül exprimierte Peptid eine Immunantwort gegen Tumorzellen, die das Peptid exprimieren.

Erfindungsgemäß können die Nukleinsäuremoleküle auch in einem Vektor vorliegen.

Darüber hinaus betrifft die Erfindung Zellen, die mit Hilfe des Nukleinsäuremoleküls, welches für die Peptide kodiert, genetisch derart verändert wurde, dass sie ein Peptid mit der Sequenz ID-Nr. 1 bis 79 produziert.

Die Zellen werden hierfür mit der für die Peptide kodierenden DNA oder der entsprechenden RNA transfiziert, wodurch die Peptide auf den Zellen zur Expression gebracht werden. Für einen

solchen Einsatz sind als Antigen-präsentierende Zellen bspw. dendritische Zellen, Monozyten oder B-Lymphozyten geeignet.

Es versteht sich, dass die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in der jeweils angegebenen Kombination, sondern auch in Alleinstellung verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

Ausführungsbeispiele der Erfindung werden in den nachfolgenden Beispielen und den beigefügten Figuren dargestellt und erläutert. Es zeigen:

- Fig. 1 die Detektion von Keratin 18-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten;
- Fig. 2a-d die Induktion von c-Met- (SEQ ID-Nr. 1), Fig. 2a+b oder Adipophilin- (SEQ ID-Nr. 2), Fig. 2c+d, Peptid-spezifischen CTL-Antworten *in vitro*;
- Fig. 3a-f die Antigen-spezifische Lyse von c-Met- oder Adipophilin-exprimierenden Tumor-Zelllinien durch CTL, induziert durch c-Met- (SEQ ID-Nr. 1), Fig. 3a-d, oder Adipophilin- (SEQ ID Nr. 2), Fig. 3e-f, Peptid-induzierten CTL;
- Fig. 4a-c Lysis-Inhibitionsassays mit <sup>51</sup>Cr-markierten Tumorzellen und unmarkierten, Peptid-gepulsten T2-Zellen durch c-Met- (SEQ ID-Nr. 1), Fig. 4a+b, oder Adipophilin-(SEQ ID-Nr. 2), Fig. 4c, Peptid-induzierten CTL;



Fig. 5a+b die Lyse von autologen, mit Tumor-RNA transfizierten DC durch c-Met- (SEQ ID-Nr. 1), Fig. 5a, oder Adipophilin-(SEQ ID-Nr. 2), Fig. 5b, Peptid induzierte CTL;

Fig. 6 *in-vitro*-induzierte Adipophilin-spezifische autologe CTL erkennen autologe Tumorzellen eines Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie, aber nicht autologe dendritische oder B-Zellen.

### Beispiel 1

#### 1.1. Patientenproben

Von der Abteilung für Urologie, Universität Tübingen, wurden zwei Proben erhalten, die von Patienten stammten, die histologisch bestätigte Nierenzelltumore aufwiesen. Beide Patienten hatten keine präoperative Therapie erhalten. Patient Nr. 1 (im folgenden mit RCC01 bezeichnet) besaß die folgende HLA-Typisierung: HLA-A\*02 A\*68 B\*18 B\*44; der Patient Nr. 2 (im folgenden mit RCC13 bezeichnet) HLA-A\*02 A\*24 B\*07 B\*40.

#### 1.2. Isolierung der MHC-Klasse-I-gebundenen Peptide

Die schockgefrorenen Tumorproben wurden prozessiert wie bereits beschrieben in Schirle, M. et al., Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach, 2000, European Journal of Immunology, 30:2216-2225. Die Peptide wurden nach Standardprotokollen isoliert, und zwar unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers W6/32, der spezifisch für die HLA-Klasse-I-Moleküle ist, oder des monoklonalen



Antikörpers BB7.2, der für HLA-A2 spezifisch ist. Barnstable, C.J. et al., Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis, 1978, Cell, 14:9-20 und Parham, P. & Brodsky, F.M., Partial purification and some properties of BB7.2. A cytotoxic monoclonal antibody with specificity for HLA-A2 and a variant of HLA-A28, 1981, Hum. Immunol., 3:277-299, beschrieben die Herstellung und Anwendung dieser Antikörper.

### 1.3. Massenspektroskopie

Peptide, die aus dem Tumorgewebe des Patienten RCC01 gewonnen wurden, wurden durch "reversed phase HPLC" getrennt (SMART-System,  $\mu$ RPC C2/C18 SC 2.1/19, Amersham Pharmacia Biotech) und die erhaltenen Fraktionen durch nanoESI MS analysiert. Dabei wurde vorgegangen, wie beschrieben in Schirle, M. et al., Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach, 2000, European Journal of Immunology, 30:2216-2225.

Die Peptide, die aus Tumorgewebe des Patienten RCC13 gewonnen wurden, wurden wie eben erwähnt durch Kapillar-LC-MS identifiziert, allerdings mit geringfügigen Änderungen: 100  $\mu$ l der Proben wurden jeweils geladen, entsalzt und auf einer 300  $\mu$ m \* 5 mm C18  $\mu$ -Vorsäule (LC Packings) vorkonzentriert. Das Lösungsmittel und die Probe wurden mittels einer Spritzenpumpe (PHD 2000, Harvard Apparatur, Inc.) mit einer abgedichteten 100  $\mu$ l-Spritze (1710 RNR, Hamilton) mit einer Geschwindigkeit von 2  $\mu$ l/min zugeführt. Zur Trennung der Peptide wurde die Vorkonzentrierungssäule vor eine 75  $\mu$ m \* 250 mm C-18-Säule (LC Pa-

ckings) geschaltet. Anschließend wurde ein binärer Gradient mit 25-60% B innerhalb von 70 min gefahren, wobei die Flussrate von 12 µl/min auf ungefähr 300 nl/min reduziert wurde, und zwar unter Verwendung eines TEE-Anschlusses (ZT1C, Valco) und einer 300 µm \* 150 mm C-18-Säule.

Um sicherzustellen, dass das System frei von restlichen Peptiden war, wurde jeweils eine Leer-Probe gemessen. Online-Fragmentierung wurde wie beschrieben durchgeführt, und die Spektren der Fragmente wurden manuell analysiert. Die Datenbankrecherchen (NCBI nr, EST) wurden unter Verwendung von MASCOT durchgeführt (<http://www.matrixscience.com>).

#### 1.4. Identifizierung von 77 MHC-Klasse-I-Liganden aus Tumorge-webe des Patienten RCC01

In der beigefügten Tabelle 1 sind die Liganden aufgeführt, die an HLA-A\*02, HLA-A\*68, HLA-B\*18 oder HLA-B\*44 gebunden waren. Die Peptide, die mit HLA-A\*02 assoziiert waren, wiesen das allel-spezifische Peptidmotiv auf: So waren an Position 2 Leucin, Valin, Isoleucin, Alanin oder Methionin und am C-Terminus Leucin, Valin, Isoleucin, oder Alanin zu finden. Die meisten der Liganden stammten von sogenannten "housekeeping"-Proteinen ab, jedoch konnten auch Liganden von Proteinen identifiziert werden, die mit Tumoren assoziiert sind.

Mit HLA-A\*68 assoziierte Liganden wurden durch ihre Ankeramino-säuren Threonin, Isoleucin, Valin, Alanin oder Leucin an Position 2 und Arginin oder Lysin am C-terminalen Ende identifiziert. Dies deutete auf den Subtyp HLA-A\*6801 hin. Zu den HLA-A\*68-assoziierten Peptiden zählten zwei Liganden von Adipophi-

lin, MTSALPEIQK und MAGDIYSVFR, weiterhin auch das vom Tumor-assoziierten Cyclin D1 abstammende ETIPLTAEKL. Von Annexin II stammt das Peptid TIVNILTNR ab, dieses Protein erwies sich im Zusammenhang mit MHC-Klasse-II bei Melanom-Patienten als immunogen (siehe Heinzel et al., The self peptide annexin II (208 - 223) presented by dendritic cells sensitizes autologous CD4+ T lymphocytes to recognize melanoma cells, 2001, Cancer Immunol. Immunother. 49:671-678). Die weiteren Liganden wiesen an Position 2 Glutaminsäure auf, welche eine Ankeramino-säure für den HLA-B\*44-Subtyp ist. Das Peptidmotiv für HLA-B\*18 ist bislang unbekannt, weshalb die Liganden dieser beiden HLA-B-Moleküle nicht unterschieden werden konnten.

#### 1.5. MHC-Klasse-I-Liganden aus Tumorgewebe des Patienten RCC13

Auch für dieses Tumorgewebe konnten die gleichen Liganden identifiziert werden, die bei dem Patienten RCC01 identifiziert wurden und die von met-Protoonkogen (c-Met) und Keratin 18 abstammten. Dies waren die Peptide mit der SEQ ID-Nr. Nr. 1 und 3. Darüber hinaus konnten noch andere Liganden aus diesem Tumorgewebe gewonnen werden: So wurde bspw. ein Ligand identifiziert, der von der Nicotinamid-N-Methyltransferase (NNMT) abstammt, einem Gen, das in mehr als 95 % aller Nierentumore überexprimiert wird. Weiterhin überlappen einige weitere Liganden mit dem Peptid-Repertoire von RCC01.

#### 1.6. Nachweis von Keratin 18-spezifischen T-Zellen im normalen CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Repertoire

Mononucleare Zellen aus peripherem Blut gesunder Patienten wurden mit HLA-A\*0201-Tetrameren gefärbt, welche entweder mit

den Adipophilin-, Keratin 18- oder met-Protoonkogen (c-Met)-Peptiden konstituiert waren: Zur Herstellung der Tetramere wurden rekombinante HLA-A\*0201-Moleküle *in vitro* mit den Peptiden SVASTITGV (SEQ ID-Nr. 2, Adipophilin), ALLNIKVKL (SEQ ID-Nr. 3, Keratin 18) oder YVDPVITSI (SEQ ID-Nr. 1, met-Protoonkogen, c-Met) konstituiert, durch Gelfiltration gereinigt, biotinyliert und mit Streptavidin zur Verknüpfung der Monomere gemischt.

Überraschenderweise konnte eine signifikante Population von CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten gefunden werden, die für Keratin 18 bei vier von 22 gesunden Patienten spezifisch war. In Fig. 1 sind die Ergebnisse der Doppelfärbung anhand von Dotplots gezeigt, wobei die mittlere Reihe die Ergebnisse der Färbung mit Keratin 18 zeigt. Zwischen 0,02 und 0,2 % der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen war spezifisch für Keratin 18. Aus der unteren Reihe der Dotplots ist zu erkennen, dass diese Bindung des Keratin 18-Tetramers spezifisch war.

### Beispiel 2

Um die Präsentation der Peptide mit der SEQ ID-Nr. 1 (YVDPVITSI) (Peptidfragment des c-Met-Protoonkogens) und SEQ ID Nr. 2 (Peptidfragment von Adipophilin) durch Tumorzellen und die Erkennung der Peptide durch CTL zu analysieren, wurden *in vitro* CTL induziert, die spezifisch für das c-Met-Peptid (Peptid mit der SEQ ID-Nr. 1) waren und CTL, die spezifisch für das Adipophilin-Peptid (SEQ ID-Nr. 2) waren. Dazu wurden dendritische Zellen (DC) eingesetzt, die aus peripheren Blutmononukleären-Zellen (PBMNC) von gesunden, HLA-A\*02-positiven Spendern stammten.

### 2.1. Gewinnung der DC

Die DC wurden durch Ficoll/Paque-(Biochrom, Berlin, Deutschland)-Dichtegradienten-Zentrifugation aus PBMNC von heparinisiertem Blut isoliert. Das heparinisierte Blut wurde aus „buffy coat“-Präparationen gesunder Spender der Blutbank der Universität Tübingen gewonnen. Die Zellen wurden auf 6-well-Platten (Falcon, Heidelberg, Deutschland) ( $1 \times 10^7$  Zellen/ 3 ml pro well) in RP10 Medium (RPMI 1640, ergänzt mit 10 % Hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum und mit Antibiotika) ausgesät. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die nicht-adhärrierenden Zellen entfernt und die adhärrierenden Blutmonozyten in RP10 Medium kultiviert, wobei folgende Zytokine ins Medium ergänzend zugegeben wurden: humanes rekombinantes GM-CSF (granulocyte makrophage colony stimulating factor; Leukomax, Novartis; 100ng/ml), Interleukin IL-4 (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland; 1000 IU/ml) und TNF- $\alpha$  (Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ ) (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland; 10 ng/ml).

### 2.2. Synthese der Peptide

Beispielhaft wurden zwei HLA-A\*02 bindenden Peptide (c-Met (SEQ ID-Nr. 1, YVDPVITSI) oder Adipophilin (SEQ-ID-Nr. 2, SVASTITGV), die wie oben erläutert identifiziert wurden) durch Verwendung von F-moc (9-Fluorenylmethyloxycarbonyl) - Schutzgruppen auf einem Peptid-Synthetisierer (432A, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) synthetisiert und durch „reversed phase“ HPLC und Massenspektroskopie analysiert. Auf diese Weise können ausreichende Mengen an den identifizierten Peptiden hergestellt werden.

### 2.3. Induktion einer Antigen-spezifischen CTL-Antwort unter Einsatz von HLA-A\*02 restringierten synthetischen Peptiden

Zur Induktion von CTL wurden die in Schritt 2.1. gewonnenen DC ( $5 \times 10^5$ ) mit den aus Schritt 2.2. erhaltenen Peptiden mit der SEQ ID-Nr. 1 oder der SEQ ID-Nr. 2 mit je  $50 \mu\text{g/ml}$  für 2 Stunden gepulst, anschließend gewaschen und mit  $2,5 \times 10^6$  autologen PBMNC in RP10 Medium inkubiert. Nach einer 7-tägigen Kultivierungszeit wurden die Zellen mit autologen, Peptid-gepulsten PBMNC restimuliert. Dabei wurde  $1 \text{ ng/ml}$  humanes rekombinantes Interleukin IL-2 (R&D Systems) an den Tagen 1, 3 und 5 hinzugefügt. Die zytotoxische Aktivität von auf diese Weise induzierten CTL wurde an Tag 5 nach der letzten Restimulierung mittels eines standardisierten  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungs-Assays (siehe unten, unter 2.4.: CTL-Assay) untersucht.

### 2.4. CTL-Assay

Für die CTL-Assays wurden als Target-Zellen Tumorzellen, Peptid-gepulste Zellen verschiedener Zelllinien und autologe DC verwendet. Peptid-gepulste Zellen wurden mit  $50 \mu\text{g/ml}$  Peptid (SEQ ID-Nr. 1 oder SEQ ID-Nr. 2) 2 Stunden lang gepulst. Alle Target-Zellen wurden in RP10Medium (RPMI 1640, ergänzt mit 10 % Hitze-inaktiviertem fetalem Kälberserum und mit Antibiotika) 1 Stunde lang bei  $37^\circ\text{C}$  mit  $^{51}\text{Cr}$ -Natriumchromat ( $^{51}\text{Cr}$ ) markiert. Anschließend wurden jeweils  $10^4$  Zellen/pro well auf eine 96-well-Platte mit abgerundetem Boden gegeben. Verschiedene Mengen an CTL wurden hinzugefügt, um ein Endvolumen von  $200 \mu\text{l}$  zu erreichen, mit anschließender Inkubation für 4 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$ . Danach wurden die Überstände ( $50 \mu\text{l/well}$ ) geerntet und in einem beta-Platten-Zähler ausgezählt. Die spezifische Lyse



wurde in Prozent folgendermaßen berechnet:  $100 \times (\text{experimentelle Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung} / \text{maximale Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung})$ . Die spontane und die maximale Freisetzung wurde jeweils in Gegenwart von entweder Medium oder 2 % Triton X-100 bestimmt.

## 2.5. Ergebnisse der CTL-Induktion

### a) CTL-zytotoxische Aktivität gegenüber Peptid-gepulsten DC

In Fig. 2 sind die Ergebnisse des  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungs-Assays (siehe unter 2.4.) bezüglich der zytotoxischen Aktivität induzierter CTL (siehe unter 2.3.) gegenüber T2- oder DC-Zellen dargestellt. Die T2-Zelllinie ist HLA-A\*02-positiv und TAP (Transporter associated with Antigen processing) -defizient; (TAP-Peptid-Transporter transportieren Peptid-Fragmente eines Proteinantigens vom Zytosol ins endoplasmatische Retikulum, wo sie mit MHC-Molekülen assoziieren.)

In den Fig. 2a und 2b ist die zytotoxische Aktivität von CTL, die unter Verwendung des Peptids mit der SEQ ID-Nr. 1 induziert wurden, gegenüber T2-Zellen und DC gezeigt, wobei beide Zellarten zuvor mit dem (c-Met-)Peptid mit der SEQ ID-Nr. 1 (schwarz gefüllte Kästchen) oder einem irrelevanten Peptid (Survivin (= "Sv"; ELTLGEFLKL; SEQ ID-Nr. 80) oder HIV (ILKEPVHGV; Pol. HIV-1 reverse Transkriptase Peptid, Aminosäurenposition 476-484; SEQ ID-Nr. 81) gepulst wurden. In Fig. 2c und 2d ist die zytotoxische Aktivität von CTL, die unter Verwendung des Peptids mit der SEQ ID-Nr. 2 induziert wurden, gegenüber T2- und DC-Zellen gezeigt, die zuvor mit dem (Adipophilin)-Peptid mit der SEQ ID-Nr. 2 gepulst wurden.



Die spezifische Lyse, die sich in der Freisetzung von  $^{51}\text{Cr}$  spiegelt, ist in den Fig. 2a bis 2d - wie auch in den CTL-Lysis-Diagrammen der Fig. 3 bis 5 - gegen unterschiedliche Verhältnisse von Effektorzellen (CTL) zu Zielzellen (zu lysierende,  $^{51}\text{Cr}$ -markierte Zellen) aufgetragen.

Wie in den Fig. 2a bis 2d zu erkennen ist, konnte mit einer CTL-Zelllinie, die nach 2-wöchiger Restimulation gewonnen wurde, eine Antigen-spezifische Abtötung der Zellen gezeigt werden: Nur diejenigen Zellen wurden durch eine ansteigende Menge an CTL abgetötet, die entweder das c-Met-Peptid mit der SEQ ID-Nr. 1 präsentierten (Fig. 2a und 2b) oder das Adipophilin-Peptid mit der SEQ ID Nr. 2 (Fig. 2c und 2d) (siehe in den Fig. 2a bis 2d jeweils die Kurven mit den schwarz ausgefüllten Kästchen-Symbolen); die mit irrelevanten Peptiden beladenen Kontrollzellen wurden nicht abgetötet (Kurven mit leeren Kästchen-Symbolen). Dadurch konnte die Spezifität der zytolytischen Aktivität gezeigt werden.

b) CTL-zytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzelllinien

In einem nächsten Schritt wurde wiederum anhand eines  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungs-Assays getestet, ob die CTL, die spezifisch für das c-Met-Peptid mit der SEQ ID-Nr. 1 oder für das Adipophilin-Peptid mit der SEQ ID-Nr. 2 sind, Tumorzellen erkennen und lysieren, welche das c-Met-Protoonkogen oder Adipophilin endogen exprimieren.

Hierzu wurden die folgenden  $^{51}\text{Cr}$ -markierten, HLA-A\*02-positiven Zelllinien eingesetzt: HCT 116 (Darmkrebs; erhalten von Prof. G. Pawelec, Tübingen, Deutschland), A 498, MZ 1257 und MZ 1774

(Nierenzellkarzinom; erhalten Prof. A. Knuth, Frankfurt, Deutschland), MCF-7 (Brustkrebs; käuflich erworben von der ATCC, American Type Culture Collection), Mel 1479 (Melanom; erhalten von Prof. G. Pawelec, Tübingen, Deutschland) und U 266 (multiples Myelom; erhalten von Prof. G. Pawelec, Tübingen, Deutschland). Diese Zelllinien exprimieren das c-Met-Protoonkogen und Adipophilin als Zielstrukturen („targets“).

Die B-Zelllinie Croft (EBV(Epstein-Barr-Virus)-immortalisiert; HLA-A\*02-positiv; erhalten von O.J. Finn, Pittsburgh, USA) und die Zelllinie SK-OV-3 (Ovarialtumor; HLA-A\*03-positiv; erhalten von O.J. Finn, Pittsburgh, USA) wurden als Negativkontrollen in die Studien mit aufgenommen. K 562 Zellen (bspw. erhältlich bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ; ACC 10) wurden verwendet, um die Aktivität natürlicher Killerzellen (NK) zu bestimmen, da diese Zelllinie hoch sensitiv gegenüber diesen Killerzellen ist.

Alle Zelllinien wurden in RP10 Medium (RPMI 1640, ergänzt mit 10 % Hitze-inaktiviertem fetalem Kälberserum und mit Antibiotika) kultiviert.

Mit den o.g. Tumor-Zelllinien und der wie unter 2.3. induzierten CTL wurden <sup>51</sup>Cr-Freisetzungssassays (siehe unter 2.4.) durchgeführt.

Die Figuren 3a bis 3f zeigen die Ergebnisse dieser CTL-Assays, wobei in den Fig. 3a bis 3d CTL eingesetzt wurden, die unter Verwendung des c-Met-Peptids mit der SEQ ID-Nr. 1 induziert wurden, und in den Fig. 3e und 3f CTL, die unter Verwendung des Adipophilin-Peptids mit der SEQ ID-Nr. 2 induziert wurden.

Wie in den Figuren 3a bis 3f zu erkennen ist, lysierten die CTL, die für das c-Met-Peptid mit der SEQ ID-Nr. 1 (Fig. 3a bis 3d) oder für das Adipophilin-Peptid mit der SEQ ID-Nr. 2 (Fig. 3e und 3f) spezifisch sind, effizient Tumorzellen, die sowohl HLA-A\*02 als auch c-Met oder Adipophilin exprimieren (also in Fig. 3a die Zelllinie HCT 116, in Fig. 3b die Zelllinie A 498, in Fig. 3c die Zelllinien MZ 1257 und MEL 1479 und in Fig. 3d die Zelllinien MCF-7 und U 266; in Fig. 3e die Zelllinien A 498, U 266 und MCF-7, in Fig. 3f die Zelllinien MZ 1774, Mel 1479 und MZ 1257. Die spezifische Lyse wurde - wie oben unter 2.4. angegeben - durch die  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung gemessen. Die Kontroll-Zelllinie SK-OV-3 (HLA-A-\*02-negativ) hingegen wurde weder durch CTL lysiert, die durch das Peptid mit der SEQ ID-Nr. 1 induziert wurden, noch durch CTL, die durch das Peptid mit der SEQ ID-Nr. 2 induziert wurden. Dies zeigte, dass beide Peptide im Zusammenhang mit HLA-A\*02-Molekülen auf den Tumorzellen präsentiert werden müssen, um die Target-Zellen effizient zu lysieren. Ferner wird dadurch die Antigen-Spezifität und die MHC-Restriktion der CTL bestätigt.

Die *in vitro* durch das Peptid mit der SEQ ID-Nr. 1 induzierten CTL-Zellen erkannten darüber hinaus auch nicht die Zelllinie K562 (siehe Fig. 3a, 3b und 3d), was zeigt, dass die zytotoxische Aktivität nicht durch Natürliche Killerzellen (NK)-Zellen vermittelt wurde.

### c) Inhibitions-Assays

Um die Antigen-Spezifität und die MHC-Restriktion der *in-vitro*-induzierten CTL weiter zu verifizieren, wurden Inhibitions-

Assays mit nicht- $^{51}\text{Cr}$ -markierten („kalten“) Inhibitor-Zelllinien durchgeführt.

Hierbei wurde die Fähigkeit von Peptid-gepulsten Zelllinien analysiert, die Lyse von Tumor-Zellen zu inhibieren, bzw. zu kompetitieren. Dazu wurde ein Überschuss an Inhibitor (also an gepulsten, unmarkierten Zellen) eingesetzt. Das Verhältnis des Inhibitors (Peptid-gepulste Zellen) zum Target (Tumor-Zellen) betrug 20:1. Bei Lyse der Inhibitor-Zelllinien konnte kein  $^{51}\text{Cr}$  freigesetzt werden, da die Inhibitor-Zelllinien unmarkiert waren.

Als Inhibitor wurde die Zelllinie T2 (HLA-A\*02; TAP-defizient; siehe unter 2.5.a)) eingesetzt. Diese Zelllinie T2 wurde vor den Assays jeweils mit den relevanten Peptiden (SEQ ID-Nr. 1 oder 2) oder einem irrelevanten Kontrollpeptid (Survivin (=Sv), SEQ ID-Nr. 80) gepulst.

Die Ergebnisse dieser Tests sind in den Fig. 4a bis 4c gezeigt, wobei in den Fig. 4a und 4b CTL eingesetzt wurden, die durch das c-Met-Peptid mit der SEQ ID-Nr.1 induziert wurden und in Fig. 4c CTL, die durch das Adipophilin-Peptid mit der SEQ ID-Nr. 2 induziert wurden.

In Fig. 4a und 4b wurde die Lyse der  $^{51}\text{Cr}$ -markierten Zelllinien U 266 und A 498 getestet, und zwar ohne Inhibitor-Zelllinie (jeweils die Kurve mit den schwarz ausgefüllten Kästchen); mit der Inhibitor-Zelllinie T2, gepulst mit einem irrelevanten Peptid (Survivin; SEQ ID-Nr. 80; Negativkontrolle, Kurven mit den ausgefüllten Dreiecken); und mit der Inhibitor-Zelllinie

T2, gepulst mit dem c-Met-Peptid mit der SEQ ID-Nr. 1 (Kurven mit den nicht ausgefüllte Rhomben).

Ohne Vorliegen der Inhibitor-Zellen wurde eine Lyse der Tumorzellen durch CTL beobachtet (siehe in den Fig. 4a bis 4d jeweils die Kurven mit den schwarz ausgefüllten Kästchen). Wie den Abbildungen 4a und 4b ferner zu entnehmen ist, fand bei einem Überschuss an Inhibitor-Target keine Lyse der Tumorzellen statt (und somit keine  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung), sofern das Inhibitor-Target mit dem c-Met-Peptid mit der SEQ ID-Nr. 1 gepulst war (siehe jeweils die Kurven mit den nicht ausgefüllten Rhomben-Symbolen). Die Aktivität der CTL richtete sich auf die im Überschuss vorliegenden, unmarkierten T2-Zellen, so dass diese und nicht die Tumorzellen lysiert wurden. Die T2-Zellen, die mit einem irrelevanten Peptid (jeweils Survivin; SEQ ID-Nr. 80) gepulst waren, konnten die Lyse der Tumorzellen durch die CTL nicht inhibieren, so dass freigesetztes  $^{51}\text{Cr}$  gemessen werden konnte (siehe in Fig. 4a und 4b die Kurven mit den schwarz ausgefüllten Dreiecken).

Ähnliches konnte bei Verwendung von CTL beobachtet werden, die durch Einsatz des Adipophilin-Peptids mit der SEQ ID-Nr. 2 induziert wurden (siehe Fig. 4c):

Die MHC-Restriktion und die Antigen-Spezifität der zytotoxischen Aktivität, die durch die Adipophilin-induzierten CTL vermittelt wurde, konnte unter Verwendung eines HLA-A\*02-spezifischen monoklonalen Antikörpers und in einem Inhibitions-Assay mit unmarkiertem („kaltem“) Inhibitor bestätigt werden: Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Fig. 4c gezeigt. Die A 498-Tumorzellen wurden durch Zugabe des HLA-A\*02-spezifischen

Antikörpers (monoklonaler Antikörper BB7.2, IgG2b, erhalten von S. Stefanovic, Tübingen) blockiert, so dass sie durch Zugabe der CTL nicht lysiert wurden und kein  $^{51}\text{Cr}$  freigesetzt wurde (siehe Fig. 4c die Kurve mit nicht ausgefüllten Dreiecks-Symbolen). Als Kontrolle diente ein unspezifischer Antikörper, der das HLA-A\*02-Molekül nicht blockierte (ChromPure Maus IgG, Dianova, Deutschland; siehe in Fig. 4c die Kurve mit den ausgefüllten Kästchen). Für diese Inhibierungs-Versuche wurden die Zellen vor Aussaat auf den 96-well-Platten 30 min. mit 10  $\mu\text{g/ml}$  Antikörper inkubiert.

Ferner zeigte sich, dass die T2-Kompetitions-Zelllinie, die mit dem irrelevanten Peptid Survivin mit der SEQ ID-Nr. 80 gepulst wurde (T2/SV), die CTL-vermittelte Lyse der Tumor-Zelllinie A 498 nicht inhibieren konnte (siehe in Fig. 4c die Kurve mit schwarz ausgefüllten Kreisen), dass jedoch die mit dem Adipophilin-Peptid mit der SEQ ID-Nr. 2 gepulste T2-Inhibitor-Zelllinie (T2/AD) die Lyse der Tumor-Zelllinie inhibieren konnte, so dass in letzterem Fall keine  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung gemessen werden konnte (siehe in Fig. 4c die Kurve mit x-Symbolen).

d) Spezifische Lyse transfizierter DC

In einem nächsten Versuch wurde die zytotoxische Aktivität der CTL bei einem autologen Versuchsansatz analysiert. Hierzu wurden autologe DC, die aus den gleichen PBMNC gewonnen wurden wie diejenigen, die für die CTL-Induktion (siehe unter 2.2.) verwendet wurden, als Target-Zellen eingesetzt. Vor Durchführung des CTL-Assays wurden die DC mit RNA elektroporiert, welche zuvor entweder aus Tumor-Zelllinien isoliert wurde oder welche Kontroll-RNA darstellte (in vitro transkribierte EGFP-RNA



(enhanced Green fluorescent Protein-RNA); verwendetes Plasmid: pSP64 Poly(A) EGFP<sup>II</sup>, erhalten von Van Tendeloo, Antwerpen, Belgien). Die Gesamt-RNA wurde aus den Tumorzellen mittels des QIAGEN Rneasy Mini Kits (QIAGEN, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers isoliert. Menge und Reinheit der RNA wurde photometrisch bestimmt und in Aliquots bei -80°C aufbewahrt.

Vor der Elektroporation an Tag 6 wurden unreife DC zweimal mit Serum-freiem X-VIVO 20 Medium (BioWhittaker, Walkersville, USA) gewaschen und in einer Endkonzentration von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl der Zellsuspension mit 10 µg der Gesamt-RNA gemischt und in einer 4 mm Küvette mittels eines Easyject Plus<sup>TM</sup> (Peglab, Erlangen Deutschland) elektroporiert (Parameter: 300 V, 150 µF, 1540 Ω, Pulszeit: 231 ms). Nach der Elektroporation wurden die Zellen sofort in RP10 Medium überführt und wieder in den Inkubator gegeben. Mehr als 80 % der Zellen waren nach der Elektroporation lebensfähig.

Die Ergebnisse dieser Versuchsansätze sind in den Fig. 5a und 5b gezeigt. In Fig. 5a wurden CTL eingesetzt, die durch Verwendung des c-Met-Peptids mit der SEQ ID-Nr. 1 induziert waren, in Fig. 5b wurden CTL eingesetzt, die durch Verwendung des Adipophilin-Peptids mit der SEQ ID-Nr. 2 induziert waren.

Nach Durchführung des CTL-Assays mit durch das c-Met-Peptid mit der SEQ ID-Nr. 1 induzierten CTL (siehe unter 2.4.) konnte eine spezifische Lyse von DC beobachtet werden, welche mit RNA von c-Met-exprimierenden Tumor-Zelllinien (A 498 und MCF-7) elektroporiert waren (siehe in Fig. 5a die Kurven mit den schwarz ausgefüllten Symbolen). DC, die mit RNA der nicht c-



Met-exprimierenden Tumor-Zelllinie Croft elektroporiert waren, wurden hingegen nicht lysiert (siehe Kurve mit den nicht ausgefüllten Rhomben).

CTL, die durch das Adipophilin-Peptid mit der SEQ ID-Nr. 2 induziert waren, lysierten DC, welche mit RNA der Adipophilin-exprimierenden Zelllinie A 498 elektroporiert waren (siehe in Fig. 5b die Kurve mit den schwarz ausgefüllten Dreiecken). Ferner wurden DC lysiert, die mit dem Adipophilin-Peptid mit der SEQ ID-Nr. 2 gepulst waren (siehe in Fig. 5b die Kurve mit den schwarz ausgefüllten Rhomben). Hingegen wurden DC, die mit Kontroll-(EGFP)RNA elektroporiert wurden, nicht lysiert (siehe in Fig. 5b die Kurve mit den nicht ausgefüllten Dreiecken).

Dies zeigt, dass - nach Transfektion der DC mit RNA von c-Met- oder Adipophilin-positiven Tumor-Zellen - die identifizierten Peptide, also das c-Met-Peptid mit der SEQ ID-Nr. 1 und das Adipophilin-Peptid mit der SEQ ID-Nr. 2, prozessiert und präsentiert werden.

e) Induktion von Adipophilin-spezifischen CTL in einem Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie

In einem weiteren Versuch wurden aus PBMNC eines HLA-A-\*0201-positiven Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) CTL generiert, die für das Adipophilin-Peptid mit der SEQ ID-Nr. 2 spezifisch waren. Der Patient befand sich nach einer Behandlung mit Fludarabin in Remission. Ferner wurden autologe primäre CLL-Zellen und DC dieses Patienten als  $^{51}\text{Cr}$ -markierte Targets in einem Assay eingesetzt, bei welchem eine  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung durch die Peptid-induzierten CTL vermittelt wird.

Wie in Fig. 6 gezeigt ist, wurden sowohl die autologen DC dieses Patienten, welche mit dem Adipophilin-Peptid mit der SEQ ID-Nr. 2 gepulst wurden ("DC+AD"), als auch die autologen CLL-Zellen ("CLL Zellen") durch die Peptid-induzierten CTL lysiert. DC, welche mit dem irrelevanten Peptid Survivin mit der SEQ ID-Nr. 80 gepulst wurden, wurden hingegen nicht lysiert ("DC+SV"). Auch nicht-maligne B-Zellen und die Zelllinie K 562 wurden nicht durch die CTL lysiert.

Die Spezifität der CTL-Antwort wurde in einem Target-Inhibitions-Assay bestätigt, wobei als Inhibitor-Zellen die Zelllinie T2 (s.o.) eingesetzt wurde, welche jeweils mit dem Adipophilin-Peptid mit der SEQ ID-Nr. 2 oder mit dem irrelevanten Peptid Survivin mit der SEQ ID-Nr. 80 gepulst waren. Die durch Verwendung des Adipophilin-Peptids mit der SEQ ID-Nr. 2 induzierten CTL lysierten auch hier die im Überschuss vorliegenden Inhibitor-Zelllinien, die mit dem relevanten Peptid mit der SEQ ID-Nr. 2 gepulst waren, so dass die <sup>51</sup>Cr-markierten Tumorzellen in diesem Fall nicht lysiert wurden (siehe in Fig. 6 die Kurve mit den nicht ausgefüllten Kästchen).

Zusammengefasst konnten die Erfinder somit zeigen, dass die identifizierten Peptide vielversprechende Substanzen im Rahmen einer Immuntherapie bei einer Vielzahl von (Tumor-) Erkrankungen darstellen.

Tabelle 1

	Sequenz	Position/Genart	Acc. Nr.	SEQ ID-Nr.
<u>Patient RCC01</u>				
<u>HLA-A*02</u>				
1.	YVDPVITSI	654-662 met proto-oncogen	J02958	SEQ ID-Nr. 1
2.	SVASTITGV	129-137 adipose differentiation-related protein	X97324	SEQ ID-Nr. 2
3.	ALLNIKVKL	365-373 keratin 18	M26326	SEQ ID-Nr. 3
4.	ALFDGDPHL	1-9 KIAA0367	AB002365	SEQ ID-Nr. 4
5.	RLLDYVVNI	679-687 hypothetical protein FLJ20004	AB040951	SEQ ID-Nr. 5
6.	ALANGIEEV	101-109 apolipoprotein L, 3	AY014906	SEQ ID-Nr. 6
7.	QLIDKVVQL	593-601 SEC14 (S.cerevisiae)-like 1	D67029	SEQ ID-Nr. 7
8.	ALSDLEITL	389-397 mitogen inducible 2	Z24725	SEQ ID-Nr. 8
9.	ILDTGTIQL	174-182 kidney- and liver-specific gene	AB013094	SEQ ID-Nr. 9
10.	SLLGGDVVSV	27-36 delta sleep inducing peptide, immunoreactor	AF153603	SEQ ID-Nr. 10
11.	FLDGNELTL	167-175 chloride intracellular channel 1	U93205	SEQ ID-Nr. 11
12.	NLLPKLHIV	179-187 chloride intracellular channel 1	U93205	SEQ ID-Nr. 12
13.	ALASHLIEA	507-515 EH-domain containing 2	AF181263	SEQ ID-Nr. 13
14.	SLYGGTITI	296-304 hypothetical protein FLJ11189	AK000697	SEQ ID-Nr. 14

15.	FLLDKKIGV	218-226 chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	AF026166	SEQ ID-Nr. 15
16.	FLDGNEMTL	178-186 chloride intracellular channel 4	AF097330	SEQ ID-Nr. 16
17.	AIVDKVPSV	147-155 coat-protein gamma-cop	AF100756	SEQ ID-Nr. 17
18.	DVASVIVTKL	241-250 signal recognition particle 54kD	U51920	SEQ ID-Nr. 18
19.	LASVSTVL	130-137 hemoglobin, alpha 2	AF230076	SEQ ID-Nr. 19
20.	VMAPRTLVL	3-11 HLA-A		SEQ ID-Nr. 20
21.	LLFDRPMHV	267-275 hnRNP M	L03532	SEQ ID-Nr. 21
<b>HLA-A*68</b>				
22.	MTSALPIIQK	62-71 adipose differentiation-related protein	X97324	SEQ ID-Nr. 22
23.	MAGDIYSVFR	349-358 adipose differentiation-related protein	X97324	SEQ ID-Nr. 23
24.	ETIPLTAEKL	115-124 cyclin D1/PRAD1	X59798	SEQ ID-Nr. 24
25.	DVMVGPFKLR	934-943 A kinase (PRKA) anchor protein 2	AJ303079	SEQ ID-Nr. 25
26.	TIIDILTKR	64-72 annexin A1	X05908	SEQ ID-Nr. 26
27.	TIVNILTNR	55-63 annexin A2	BC001388	SEQ ID-Nr. 27
28.	TIIDIITHR	385-393 annexin A6	J03578	SEQ ID-Nr. 28
29.	SIFDGRVVAK	107-116 putative membrane protein	AB020980	SEQ ID-Nr. 29
30.	STIEYVIQR	115-123 Sec23 (S. cerevisiae) homolog B	BC005032	SEQ ID-Nr. 30
31.	ELIKPPTILR	132-141 adaptor-related protein complex 3	AF092092	SEQ ID-Nr. 31

32.	EIAMATVTALR	248-258 aldolase A, fructose- biphosphate	X12447	SEQ ID-Nr.	32
33.	ETIGEILKK	95-103 hnRNP K	BC000355	SEQ ID-Nr.	33
34.	SLADIMAKR	86-94 ribosomal protein L24	BC000690	SEQ ID-Nr.	34

**HLA-B\*44 oder HLA-B\*18**

35.	EEIAFLKKL	229-237 vimentin	M14144	SEQ ID-Nr.	35
36.	DEAAFLERL	92-100 caldesmon 1	M64110	SEQ ID-Nr.	36
37.	DEMKVLVL	545-552 spectrin, beta, non-erythro- cytic 1	M96803	SEQ ID-Nr.	37
38.	DEVKFLTV	191-198 annexin A4	M82809	SEQ ID-Nr.	38
39.	NENSLFKSL	935-943 clathrin, heavy polypeptide (Hc)	D21260	SEQ ID-Nr.	39
40.	DEFKVVVV	373-380 coat protein, gamma-cop	AF100756	SEQ ID-Nr.	40
41.	EEVKLIKMM	137-145 ferritin, light polypeptide	M11147	SEQ ID-Nr.	41
42.	DEVKLPAKL	158-166 polymerase I and transcript release factor	AF312393	SEQ ID-Nr.	42
43.	TERELKVAY	637-645 hypothetical protein FLJ20004	AB040951	SEQ ID-Nr.	43
44.	NEFSLKGVDF	86-95 ets-1	J04101	SEQ ID-Nr.	44
45.	NEQDLGIQY	169-177 catenin alpha 1	D13866	SEQ ID-Nr.	45
46.	EERIVELF	306-313 signal transducer and activator of transcription 3	BC000627	SEQ ID-Nr.	46
47.	EEIREAFRVF	84-93 calmodulin 3	J04046	SEQ ID-Nr.	47
48.	DEYIYRHFF	344-352 cell cycle progression 8 pro- tein	AF011794	SEQ ID-Nr.	48

49.	DELELHQRF	308-316 adenovirus 5 E1A binding protein	X86098	SEQ ID-Nr.	49
50.	SEVKFTVTF	80-88 galectin 2	M87842	SEQ ID-Nr.	50
51.	IETIINTF	12-19 calgranulin B	M26311	SEQ ID-Nr.	51
52.	KENPLQFKF	61-69/72-80 villin 2 (ezrin)/(radixin)	J05021/ L02320	SEQ ID-Nr.	52
53.	DEVRTLTY	41-48 hnRNP methyltransferase, S. cerevisiae-like 2	Y10807	SEQ ID-Nr.	53
54.	GEAVVNRVF	43-51 large multifunctional protease 2, LMP2	Z14977	SEQ ID-Nr.	54
55.	EEVLIPDQKY	385-394 F-box and leucine-rich repeat protein 3A	AF126028	SEQ ID-Nr.	55
56.	DEGRLVLEF	163-171 sterol O-acyltransferase 1	L21934	SEQ ID-Nr.	56
57.	DEVELIHF	838-845 chromatin-specific transcription elongation factor	AF152961	SEQ ID-Nr.	57
58.	VEVLLNYAY	83-91 NS1-binding protein	AF205218	SEQ ID-Nr.	58
59.	TENDIRVMF	120-128 CUG triplet repeat, RNA-binding protein 1	AF267534	SEQ ID-Nr.	59
60.	LEGLTVVY	62-69 coatamer protein complex subunit zeta 1	AF151878	SEQ ID-Nr.	60
61.	NELPTVAF	192-199 hypothetical protein	AK001475	SEQ ID-Nr.	61
62.	EEFGQAFSF	77-85 MHC, class II, DP alpha 1	X03100	SEQ ID-Nr.	62
63.	VEAIFSKY	33-40 hnRNP C (C1/C2)	M29063	SEQ ID-Nr.	63
64.	DERTFHIFY	277-285 myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle	M69181	SEQ ID-Nr.	64

65.	TEKVLAAVY	206-214 aldolase B, fructose- biphosphate	K01177	SEQ ID-Nr.	65
66.	VESPLSVSF	159-167 hypothetical protein FLJ22318	AK025971	SEQ ID-Nr.	66
67.	SEAGSHTLQW	MHC-I		SEQ ID-Nr.	67
68.	DEGKVIRF	56-63 EST reading frame-1	BF431469	SEQ ID-Nr.	68

Patient RCC13HLA-A\*02

69.	ALAAVVTEV	frameshift, DDX3 reading frame +2	AF061337	SEQ ID-Nr.	69
70.	TLIEDILGV	209-217 transient receptor protein 4 associated protein	AL132825	SEQ ID-Nr.	70
71.	ALFGALFLA	2-10 phospholipid transfer protein	L26232	SEQ ID-Nr.	71
72.	VLATLVLLL	72-80 EST	AA483794	SEQ ID-Nr.	72
73.	TLDDLIAAV	325-333 hypothetical protein FLJ10042	AK000904	SEQ ID-Nr.	73
74.	YLDNGVVVFV	316-324 damage-specific DNA binding protein 1 (127kD)	U18299	SEQ ID-Nr.	74
75.	SVFAGVVG	581-589 guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	U58855	SEQ ID-Nr.	75
76.	SLINVGLISV	48-57 acidic protein rich in leucines	BC000476	SEQ ID-Nr.	76
77.	ALADGVQKV	176-184 apolipoprotein L, 1)	AF323540	SEQ ID-Nr.	77

HLA-A\*24

78.	TYGEIFEKF	107-115 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, (B14.5b)	AF070652	SEQ ID-Nr.	78
79.	YYMIGEQKF	203-211 nicotinamide-n-methyltrans- ferase	U08021	SEQ ID-Nr.	79



## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Immatics Biotechnologies GmbH

<120> An MHC-Moleküle bindende Tumor-assoziierte Peptide

<130> 4648P102

<160> 79

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile  
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Val Ala Ser Thr Ile Thr Gly Val  
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Leu Leu Asn Ile Lys Val Lys Leu  
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Leu Phe Asp Gly Asp Pro His Leu  
1 5

41

<210> 5  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 5

Arg Leu Leu Asp Tyr Val Val Asn Ile  
1 5

<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Leu Ala Asn Gly Ile Glu Glu Val  
1 5

<210> 7  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 7

Gln Leu Ile Asp Lys Val Trp Gln Leu  
1 5

<210> 8  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 8

Ala Leu Ser Asp Leu Glu Ile Thr Leu  
1 5

<210> 9  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 9

Ile Leu Asp Thr Gly Thr Ile Gln Leu  
1 5

42

<210> 10  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 10

Ser Leu Leu Gly Gly Asp Val Val Ser Val  
1 5 10

<210> 11  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 11

Phe Leu Asp Gly Asn Glu Leu Thr Leu  
1 5

<210> 12  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 12

Asn Leu Leu Pro Lys Leu His Ile Val  
1 5

<210> 13  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 13

Ala Leu Ala Ser His Leu Ile Glu Ala  
1 5

<210> 14  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 14

Ser Leu Tyr Gly Gly Thr Ile Thr Ile  
1 5

43

<210> 15  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 15

Phe Leu Leu Asp Lys Lys Ile Gly Val  
1 5

<210> 16  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 16

Phe Leu Asp Gly Asn Glu Met Thr Leu  
1 5

<210> 17  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 17

Ala Ile Val Asp Lys Val Pro Ser Val  
1 5

<210> 18  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 18

Asp Val Ala Ser Val Ile Val Thr Lys Leu  
1 5 10

<210> 19  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 19

Leu Ala Ser Val Ser Thr Val Leu  
1 5

44

<210> 20  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 20

Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Val Leu  
1 5

<210> 21  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 21

Leu Leu Phe Asp Arg Pro Met His Val  
1 5

<210> 22  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 22

Met Thr Ser Ala Leu Pro Ile Ile Gln Lys  
1 5 10

<210> 23  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Ala Gly Asp Ile Tyr Ser Val Phe Arg  
1 5 10

<210> 24  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 24

Glu Thr Ile Pro Leu Thr Ala Glu Lys Leu  
1 5 10

45

<210> 25  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 25

Asp Val Met Val Gly Pro Phe Lys Leu Arg  
1 5 10

<210> 26  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 26

Thr Ile Ile Asp Ile Leu Thr Lys Arg  
1 5

<210> 27  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 27

Thr Ile Val Asn Ile Leu Thr Asn Arg  
1 5

<210> 28  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 28

Thr Ile Ile Asp Ile Ile Thr His Arg  
1 5

<210> 29  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 29

Ser Ile Phe Asp Gly Arg Val Val Ala Lys  
1 5 10



46

<210> 30  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 30

Ser Thr Ile Glu Tyr Val Ile Gln Arg  
1 5

<210> 31  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 31

Glu Leu Ile Lys Pro Pro Thr Ile Leu Arg  
1 5 10

<210> 32  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 32

Glu Ile Ala Met Ala Thr Val Thr Ala Leu Arg  
1 5 10

<210> 33  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 33

Glu Thr Ile Gly Glu Ile Leu Lys Lys  
1 5

<210> 34  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 34

Ser Leu Ala Asp Ile Met Ala Lys Arg  
1 5

47

<210> 35  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 35

Glu Glu Ile Ala Phe Leu Lys Lys Leu  
1 5

<210> 36  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 36

Asp Glu Ala Ala Phe Leu Glu Arg Leu  
1 5

<210> 37  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 37

Asp Glu Met Lys Val Leu Val Leu  
1 5

<210> 38  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 38

Asp Glu Val Lys Phe Leu Thr Val  
1 5

<210> 39  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 39

Asn Glu Asn Ser Leu Phe Lys Ser Leu  
1 5

48

<210> 40  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 40

Asp Glu Phe Lys Val Val Val Val  
1 5

<210> 41  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 41

Glu Glu Val Lys Leu Ile Lys Lys Met  
1 5

<210> 42  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 42

Asp Glu Val Lys Leu Pro Ala Lys Leu  
1 5

<210> 43  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 43

Thr Glu Arg Glu Leu Lys Val Ala Tyr  
1 5

<210> 44  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 44

Asn Glu Phe Ser Leu Lys Gly Val Asp Phe  
1 5 10

49

<210> 45  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 45

Asn Glu Gln Asp Leu Gly Ile Gln Tyr  
1 5

<210> 46  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 46

Glu Glu Arg Ile Val Glu Leu Phe  
1 5

<210> 47  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 47

Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe  
1 5 10

<210> 48  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 48

Asp Glu Tyr Ile Tyr Arg His Phe Phe  
1 5

<210> 49  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 49

Asp Glu Leu Glu Leu His Gln Arg Phe  
1 5

50

<210> 50  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 50

Ser Glu Val Lys Phe Thr Val Thr Phe  
1 5

<210> 51  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 51

Ile Glu Thr Ile Ile Asn Thr Phe  
1 5

<210> 52  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 52

Lys Glu Asn Pro Leu Gln Phe Lys Phe  
1 5

<210> 53  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 53

Asp Glu Val Arg Thr Leu Thr Tyr  
1 5

<210> 54  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 54

Gly Glu Ala Val Val Asn Arg Val Phe  
1 5

51

<210> 55  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 55

Glu Glu Val Leu Ile Pro Asp Gln Lys Tyr  
1 5 10

<210> 56  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 56

Asp Glu Gly Arg Leu Val Leu Glu Phe  
1 5

<210> 57  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 57

Asp Glu Val Glu Leu Ile His Phe  
1 5

<210> 58  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 58

Val Glu Val Leu Leu Asn Tyr Ala Tyr  
1 5

<210> 59  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 59

Thr Glu Asn Asp Ile Arg Val Met Phe  
1 5



52

<210> 60  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 60

Leu Glu Gly Leu Thr Val Val Tyr  
1 5

<210> 61  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 61

Asn Glu Leu Pro Thr Val Ala Phe  
1 5

<210> 62  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 62

Glu Glu Phe Gly Gln Ala Phe Ser Phe  
1 5

<210> 63  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 63

Val Glu Ala Ile Phe Ser Lys Tyr  
1 5

<210> 64  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 64

Asp Glu Arg Thr Phe His Ile Phe Tyr  
1 5

53

<210> 65  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 65

Thr Glu Lys Val Leu Ala Ala Val Tyr  
1 5

<210> 66  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 66

Val Glu Ser Pro Leu Ser Val Ser Phe  
1 5

<210> 67  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 67

Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Leu Gln Trp  
1 5 10

<210> 68  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 68

Asp Glu Gly Lys Val Ile Arg Phe  
1 5

<210> 69  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 69

Ala Leu Ala Ala Val Val Thr Glu Val  
1 5

54

<210> 70  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 70

Thr Leu Ile Glu Asp Ile Leu Gly Val  
1 5

<210> 71  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 71

Ala Leu Phe Gly Ala Leu Phe Leu Ala  
1 5

<210> 72  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 72

Val Leu Ala Thr Leu Val Leu Leu Leu  
1 5

<210> 73  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 73

Thr Leu Asp Asp Leu Ile Ala Ala Val  
1 5

<210> 74  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 74

Tyr Leu Asp Asn Gly Val Val Phe Val  
1 5

55

<210> 75  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 75

Ser Val Phe Ala Gly Val Val Gly Val  
1 5

<210> 76  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 76

Ser Leu Ile Asn Val Gly Leu Ile Ser Val  
1 5 10

<210> 77  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 77

Ala Leu Ala Asp Gly Val Gln Lys Val  
1 5

<210> 78  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 78

Thr Tyr Gly Glu Ile Phe Glu Lys Phe  
1 5

<210> 79  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 79

Tyr Tyr Met Ile Gly Glu Gln Lys Phe  
1 5

56

<210> 80  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 80

Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu  
1 5 10

<210> 81  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Humanes Immundefizienz Virus

<400> 81

Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val  
1 5

Patentansprüche

1. Tumor-assoziiertes Peptid mit einer Aminosäuresequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID-Nr. 1 bis SEQ ID-Nr. 79 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll, wobei das Peptid die Fähigkeit aufweist, an ein Molekül des menschlichen Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexes (MHC) Klasse-I zu binden.
2. Peptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eine Aminosäure durch eine andere Aminosäure mit ähnlichen chemischen Eigenschaften ersetzt ist.
3. Peptid nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass N- oder/und C-terminal zumindest eine weitere Aminosäure vorhanden ist.
4. Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eine Aminosäure deletiert ist.
5. Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eine Aminosäure chemisch modifiziert ist.
6. Verwendung eines oder mehrerer Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Tumorerkrankungen und/oder adenomatöser Erkrankungen.



7. Verwendung des Peptids nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Behandlung von Tumorerkrankungen und/oder adenomatöser Erkrankungen.
8. Verwendung nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Erkrankung Nieren-, Brust-, Pankreas-, Magen-, Blasen- und/oder Hodenkrebs ist.
9. Verwendung nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid zusammen mit einem Adjuvans eingesetzt wird.
10. Verwendung nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid gebunden auf einer Antigen-präsentierenden Zelle eingesetzt wird.
11. Verwendung des Peptids nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Markierung von Leukozyten, insbesondere von T-Lymphozyten.
12. Verwendung nach Anspruch 11 zur Beurteilung eines Therapieverlaufs bei einer Tumorerkrankung.
13. Verwendung des Peptids nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Herstellung eines Antikörpers.
14. Pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend eines oder mehrere Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 5.
15. Nukleinsäuremolekül kodierend für das Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 5.

16. Vektor umfassend das Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 15.
17. Zelle, die mit Hilfe des Nukleinsäuremoleküls nach Anspruch 15 oder mit Hilfe des Vektors nach Anspruch 16 genetisch derart verändert wurde, dass sie ein Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 5 produziert.

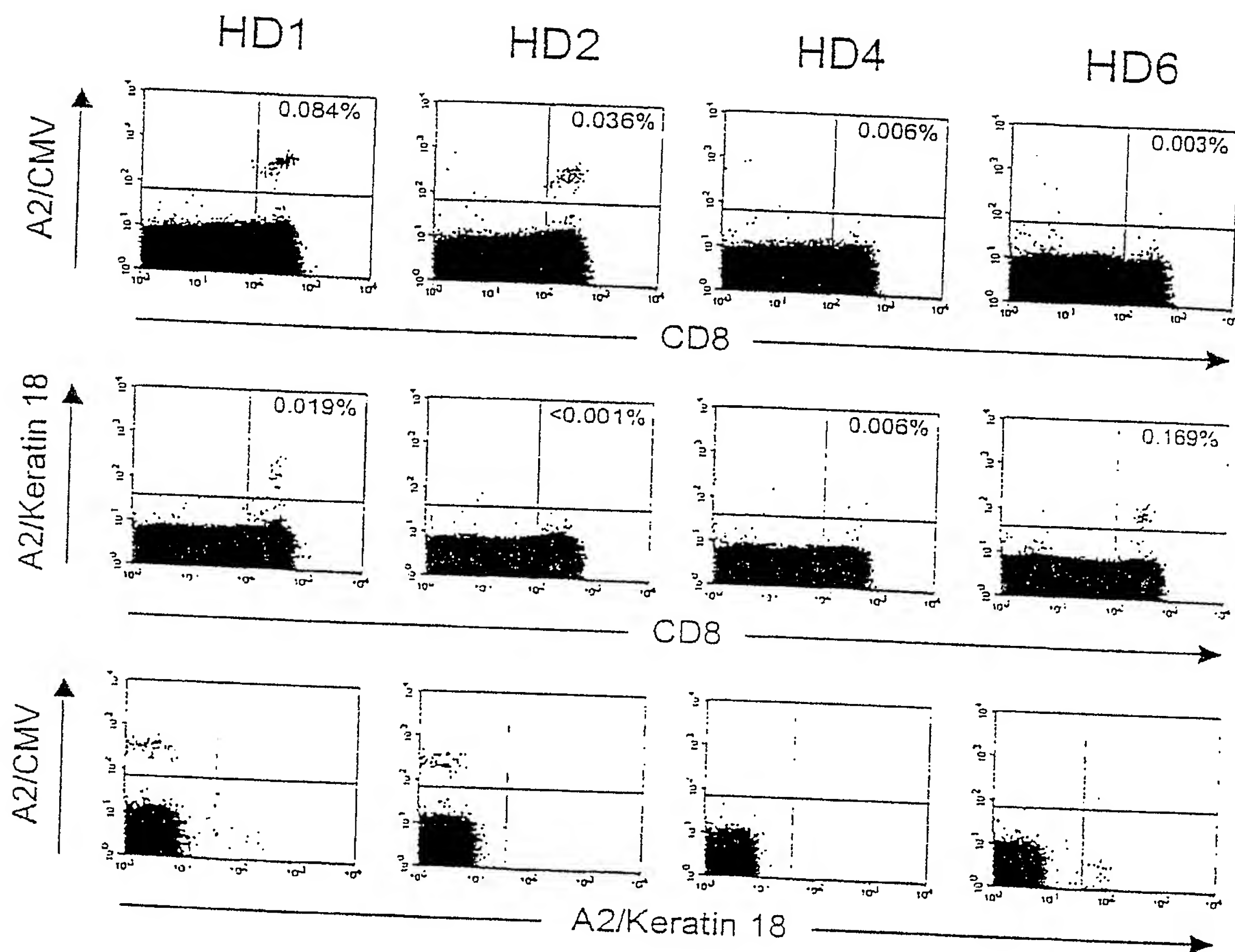


Fig. 1

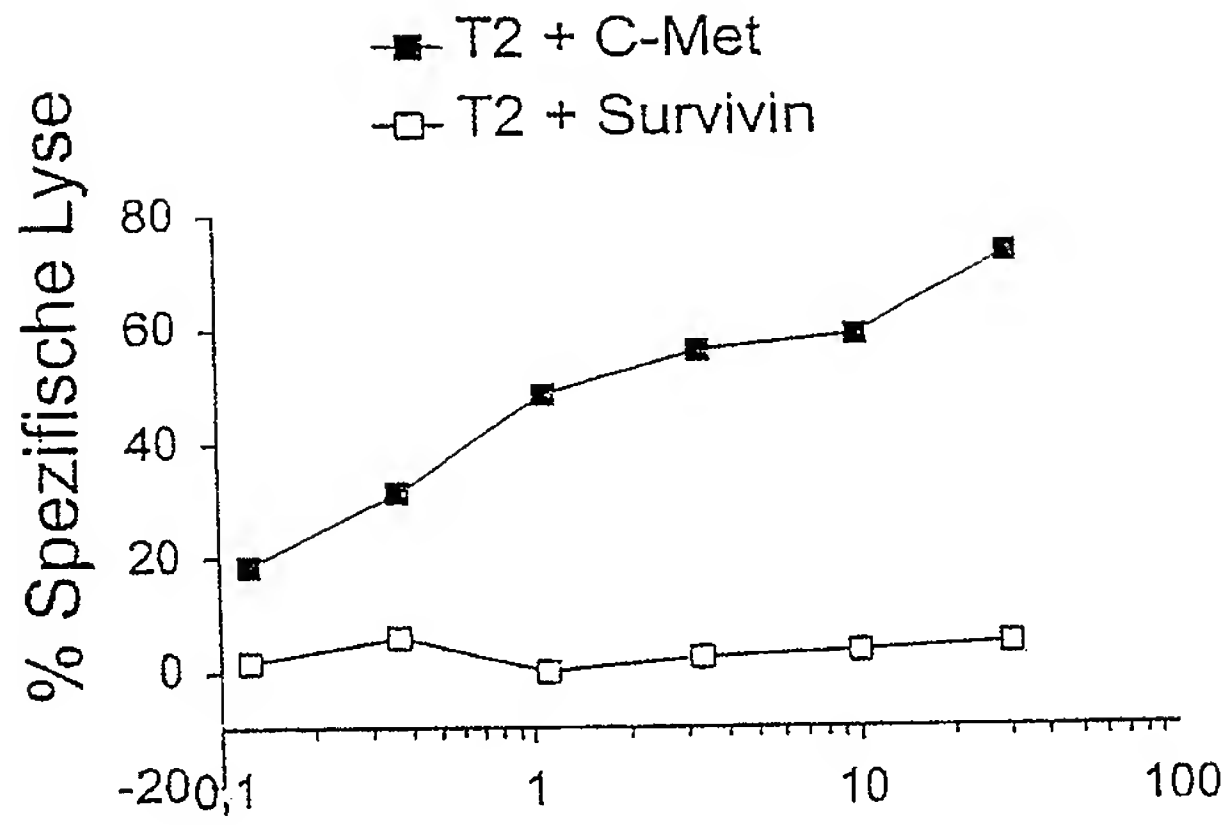


Fig. 2a

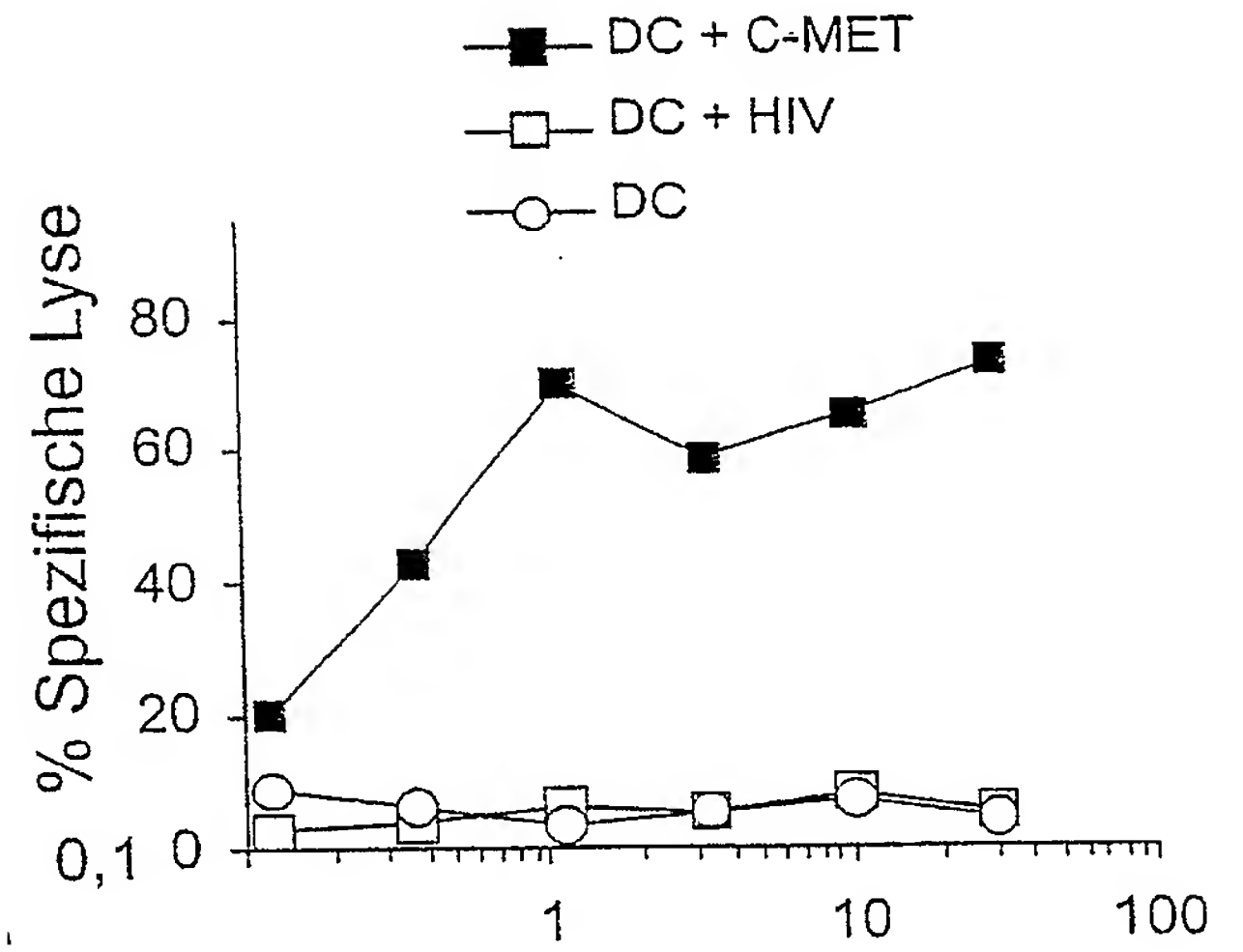


Fig. 2b

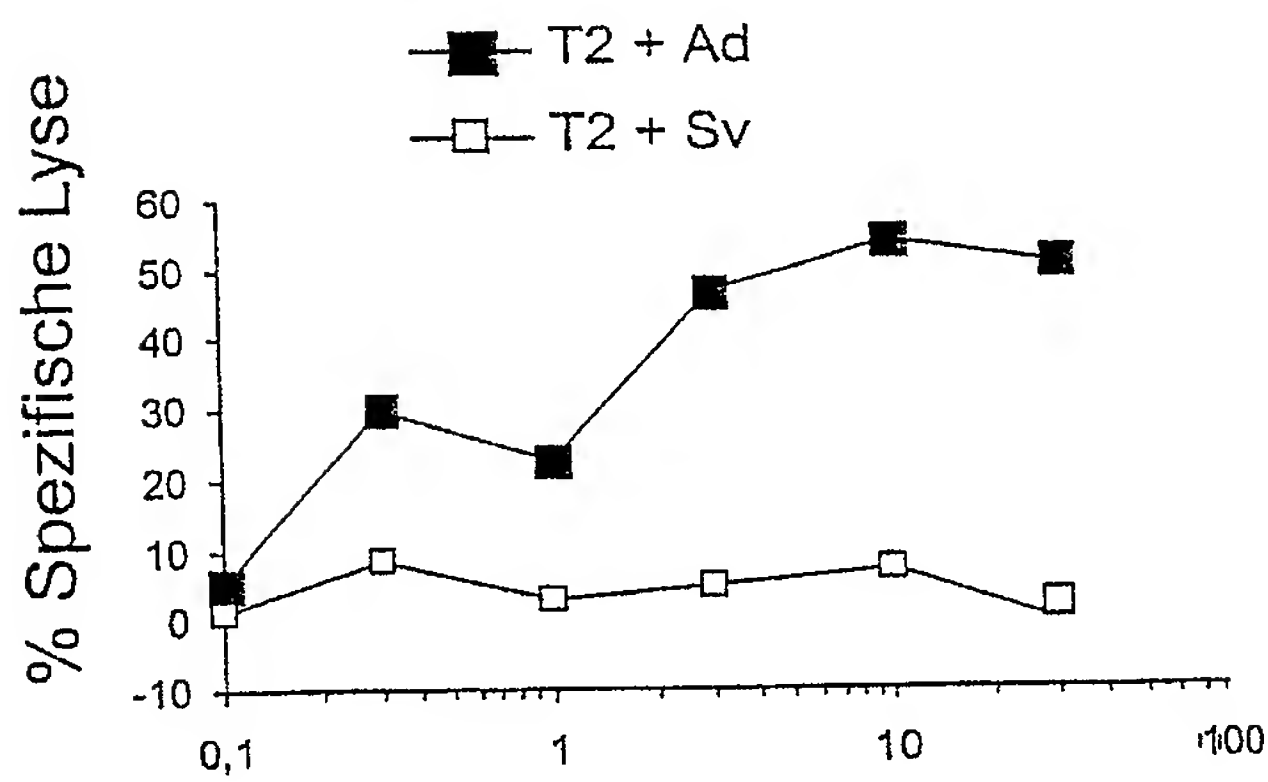


Fig. 2c

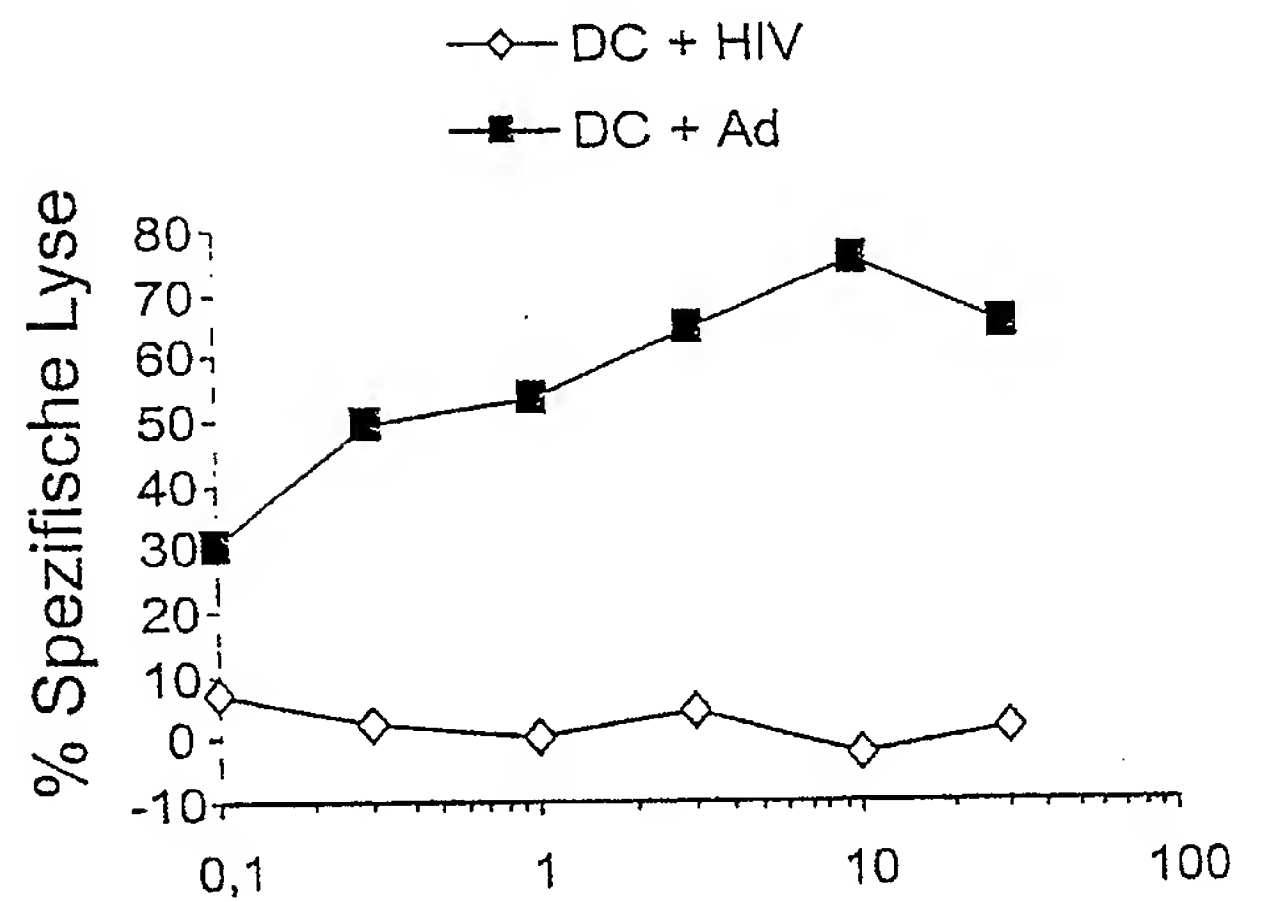


Fig. 2d

3 / 7

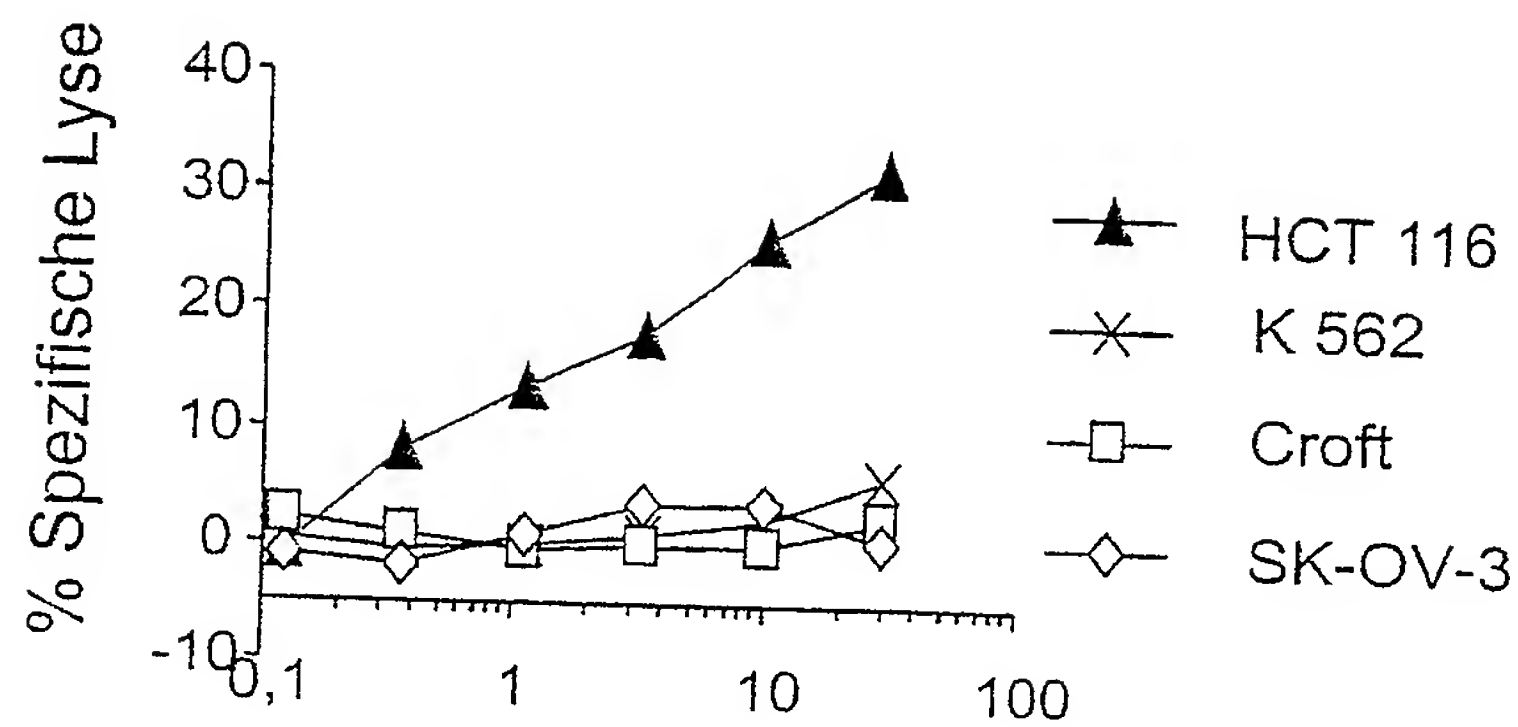


Fig. 3a

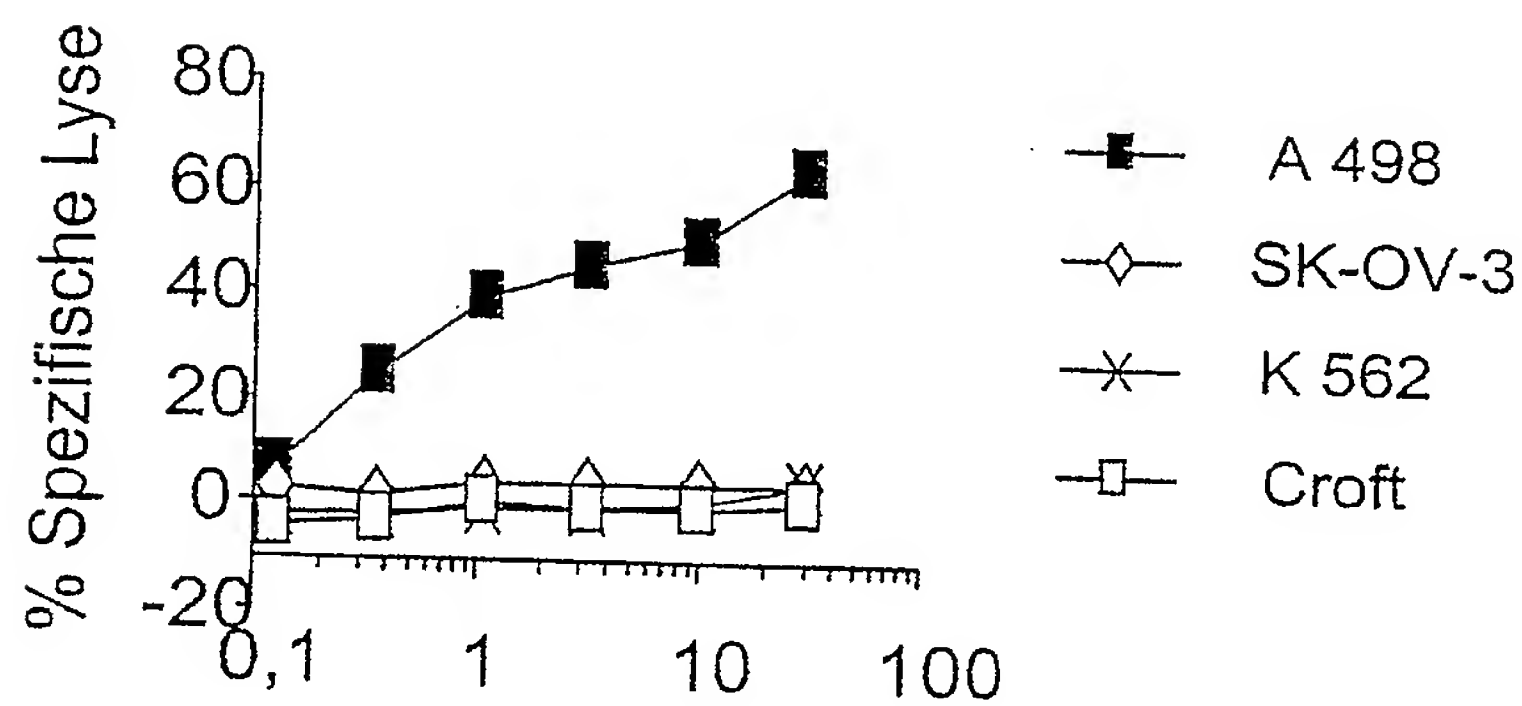


Fig. 3b

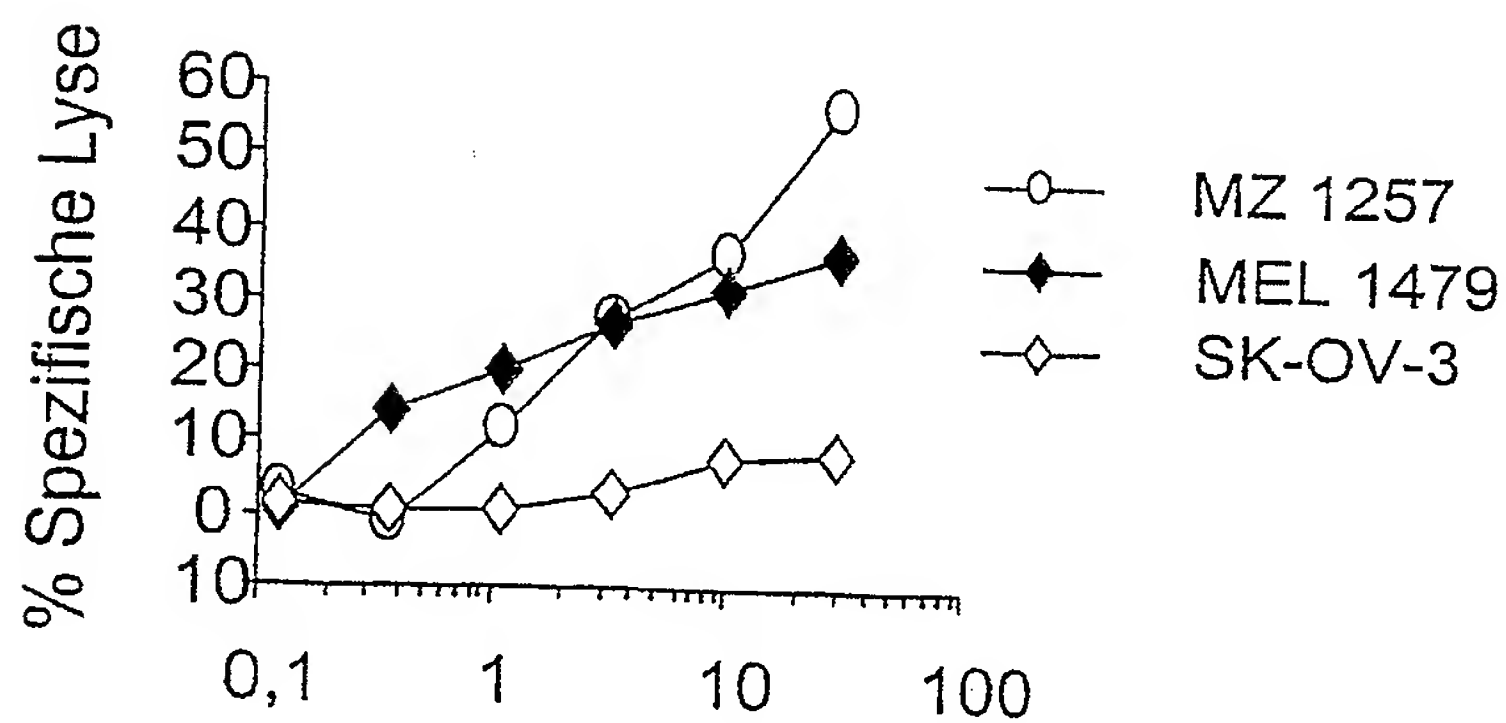


Fig. 3c

4 / 7

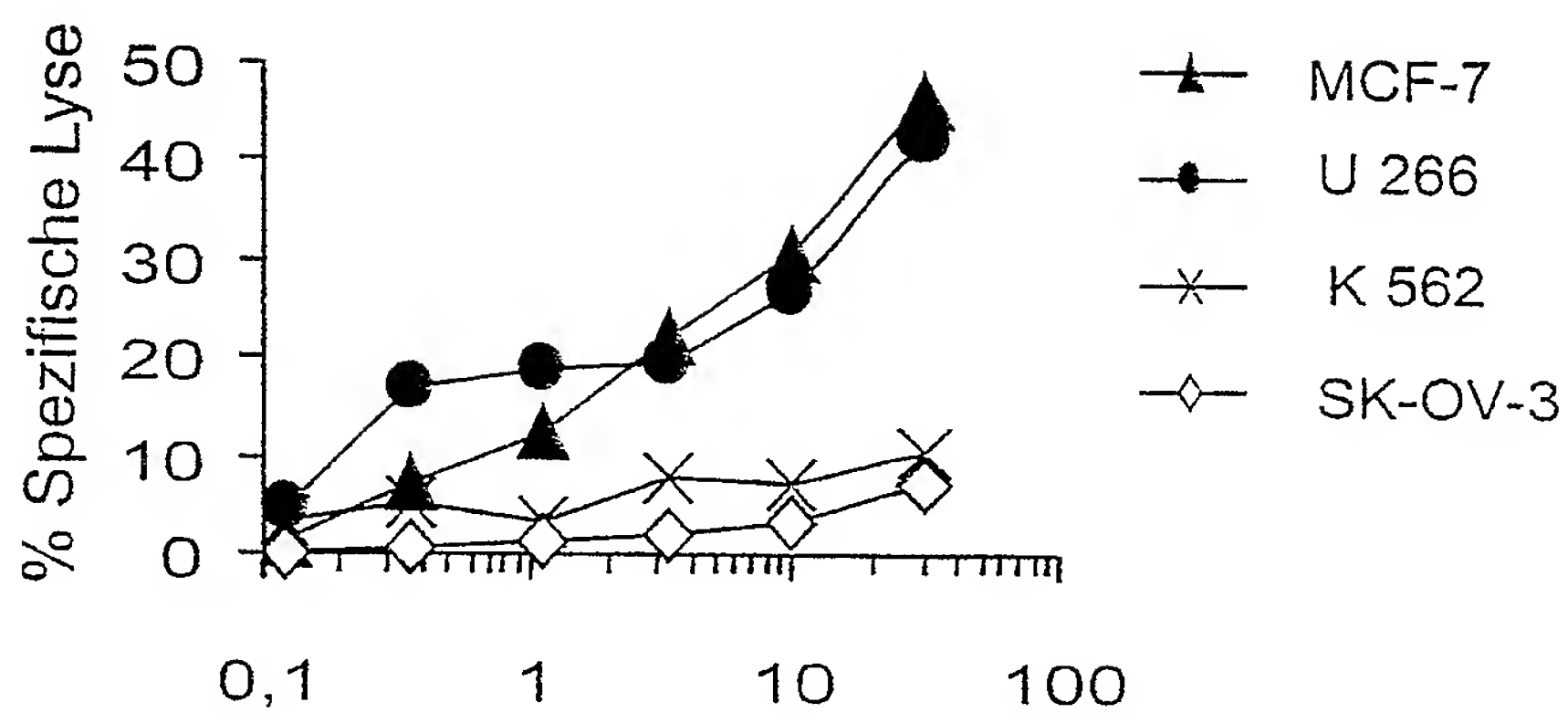


Fig. 3d

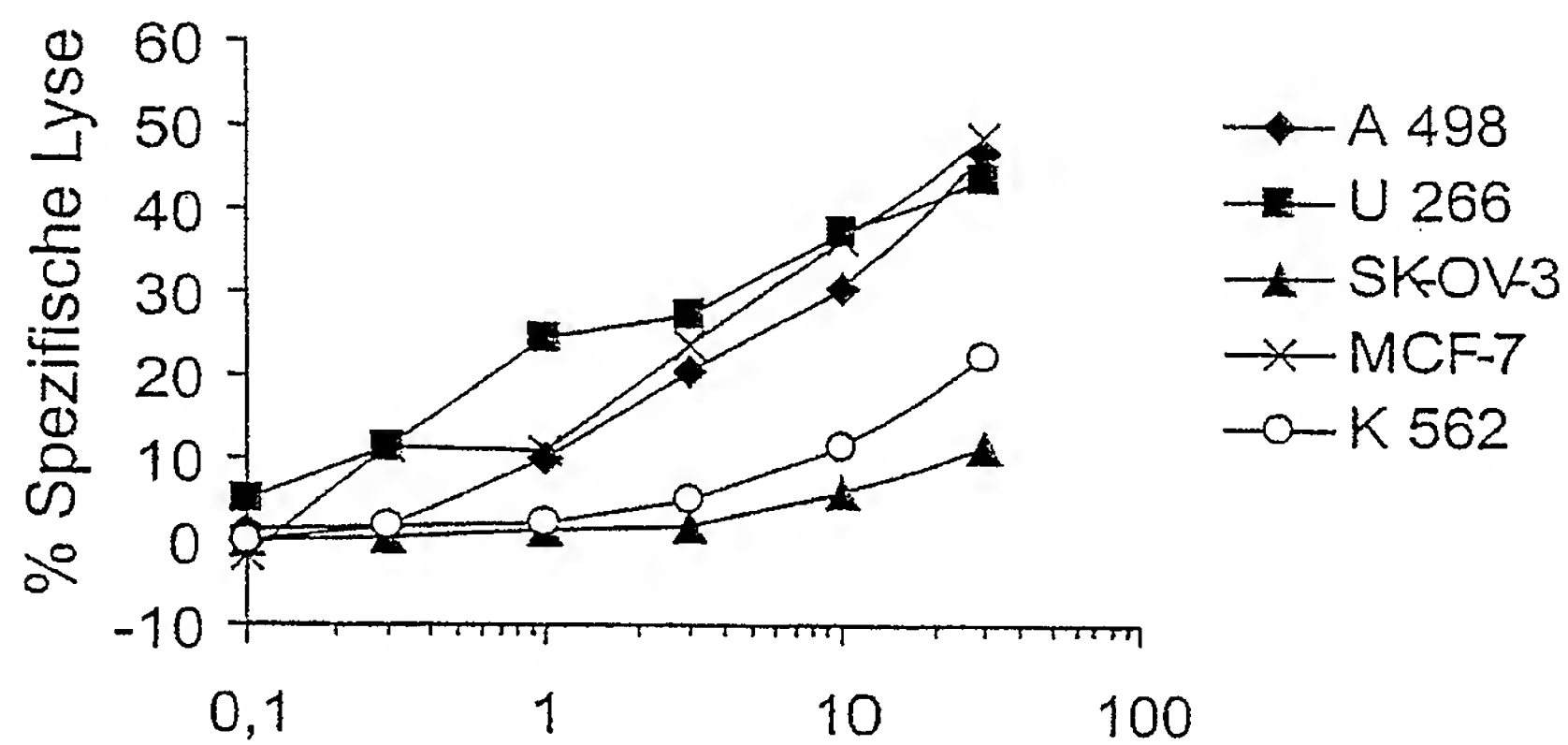


Fig. 3e

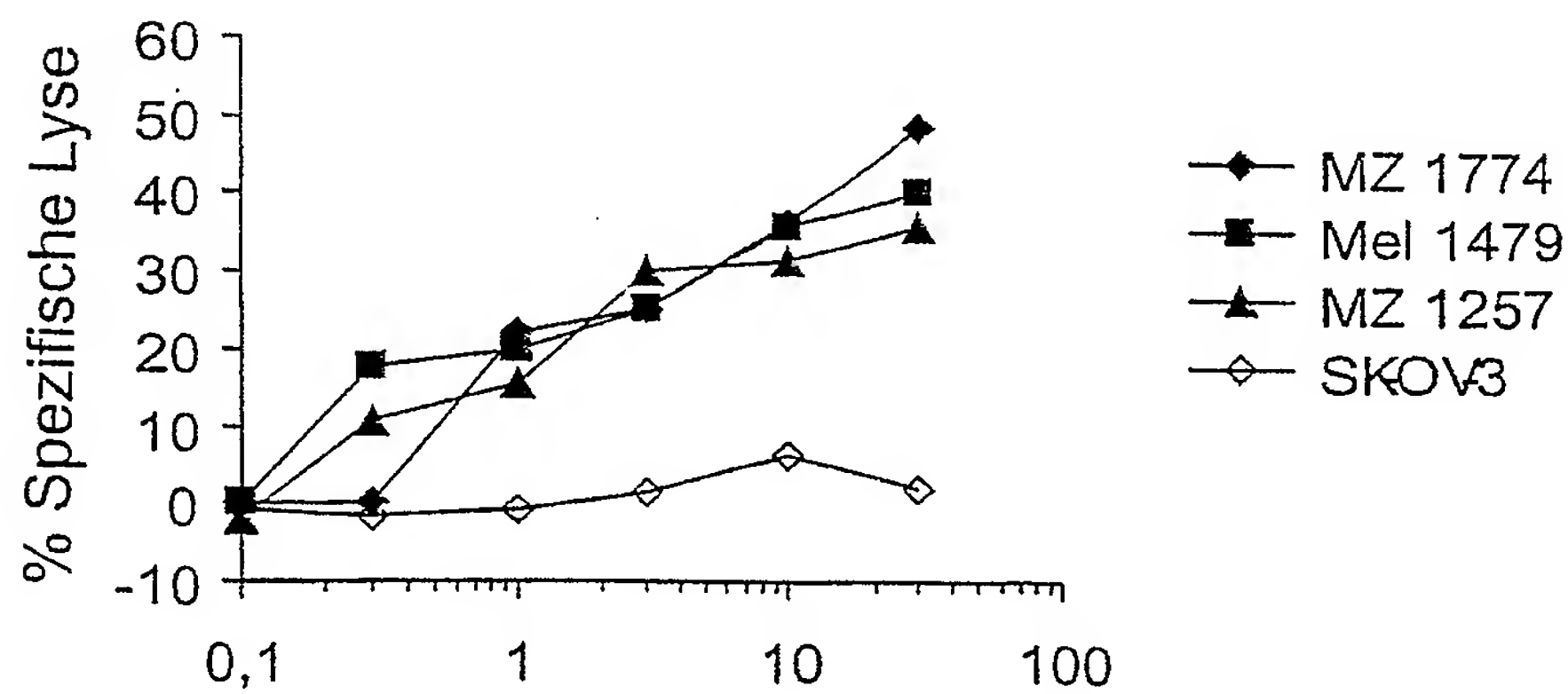


Fig. 3f

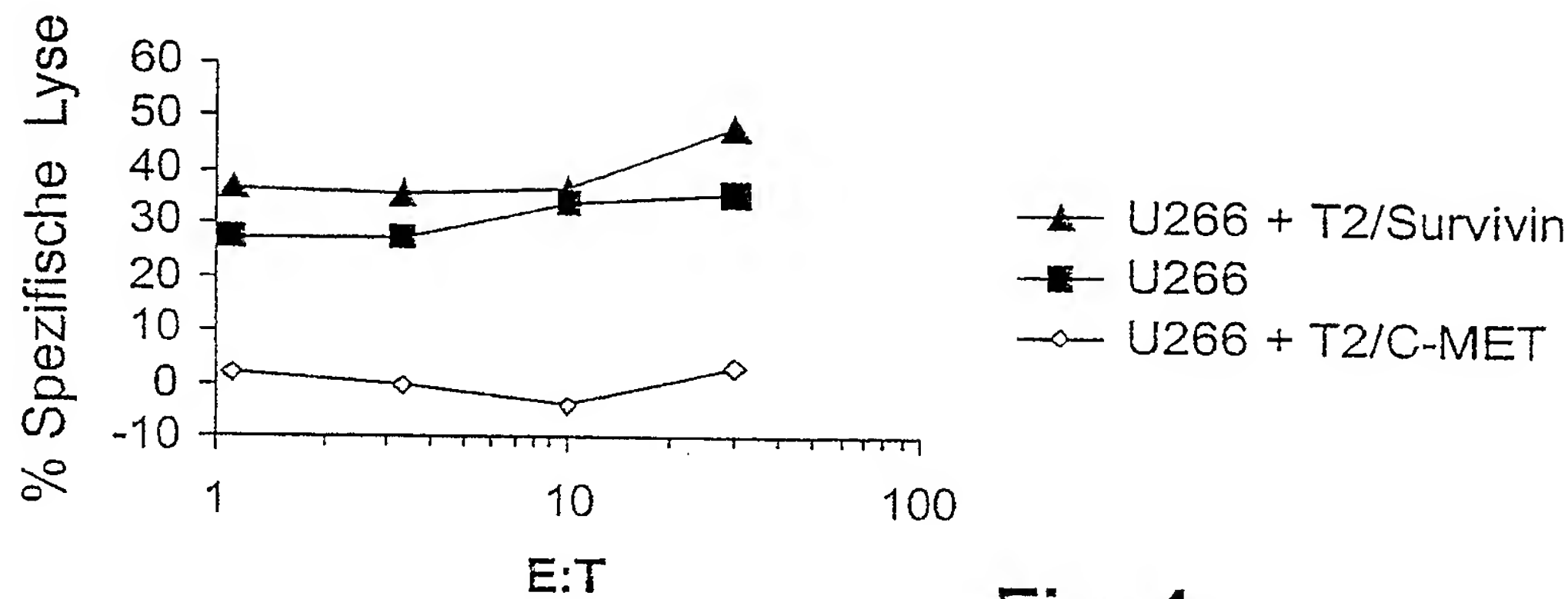


Fig. 4a

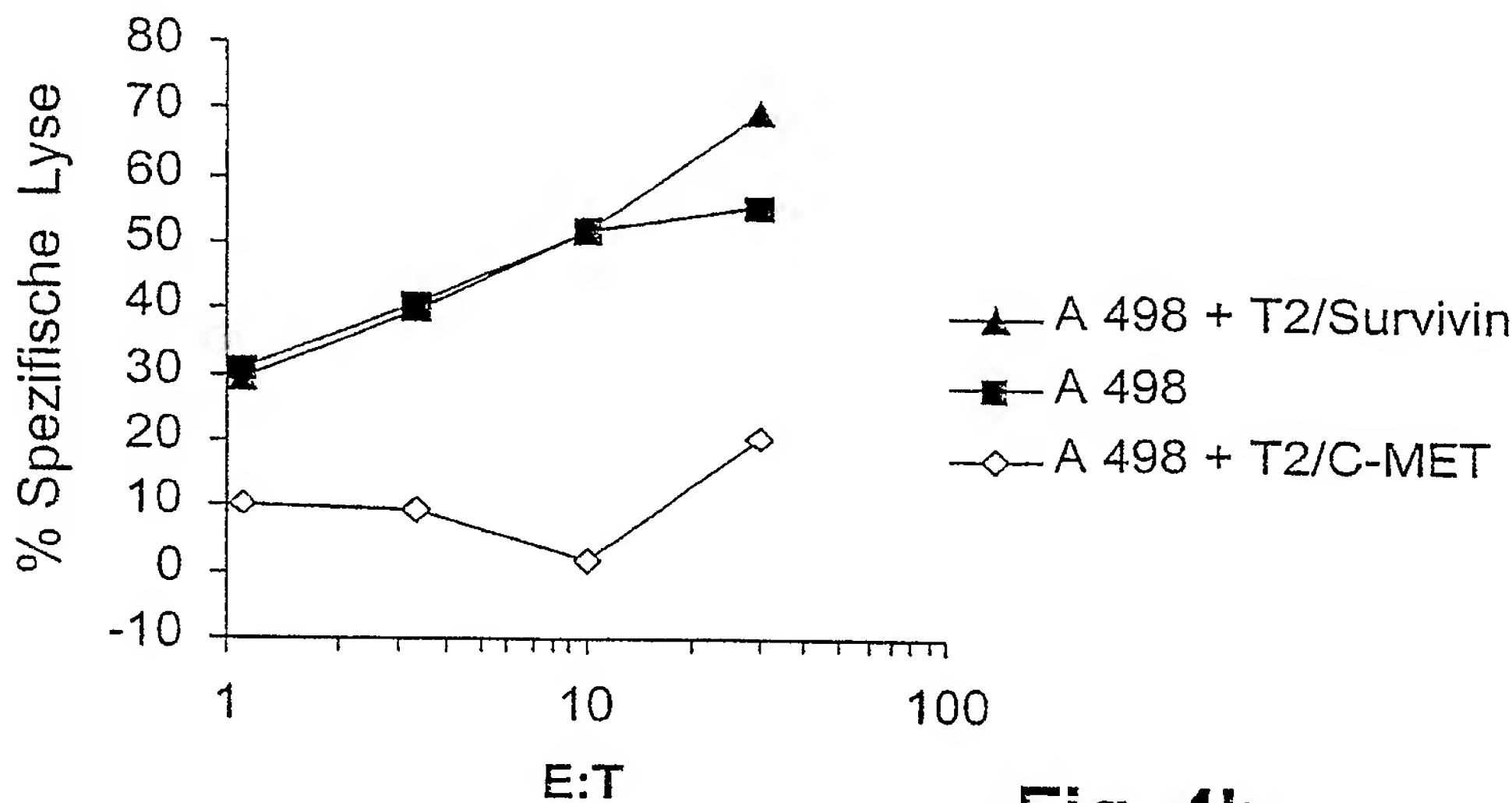


Fig. 4b

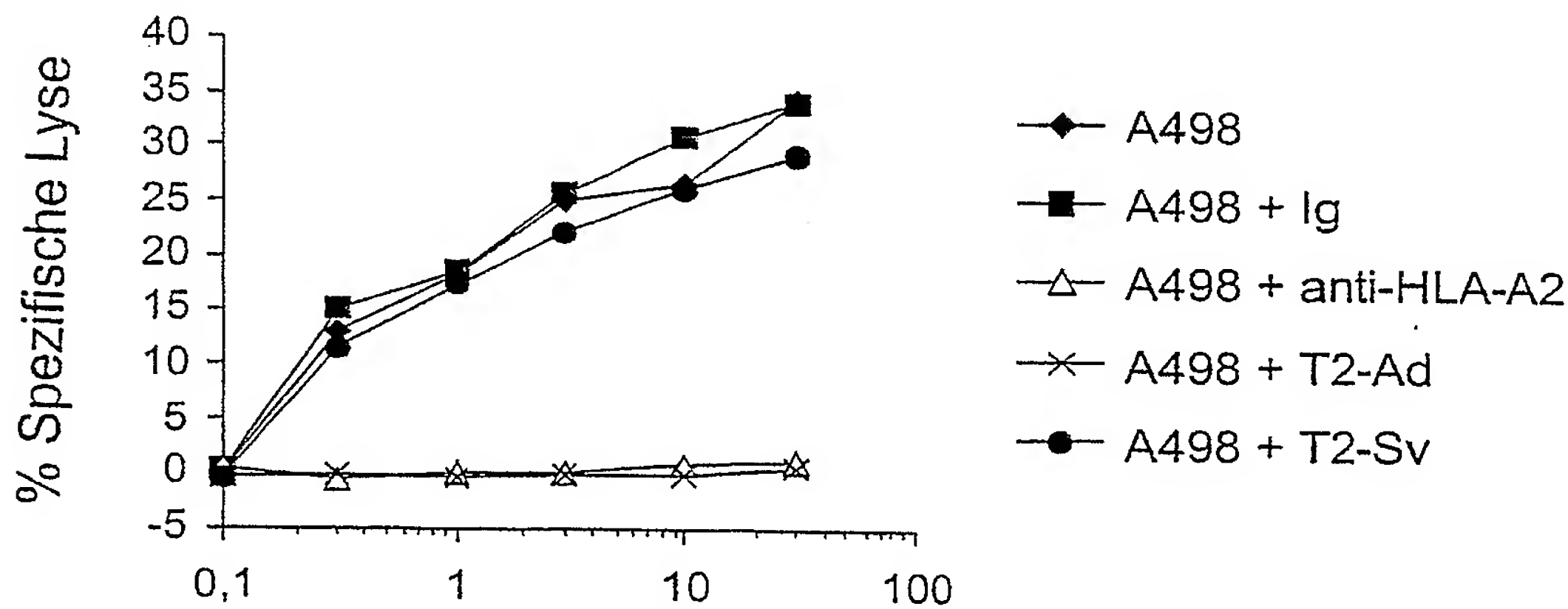


Fig. 4c



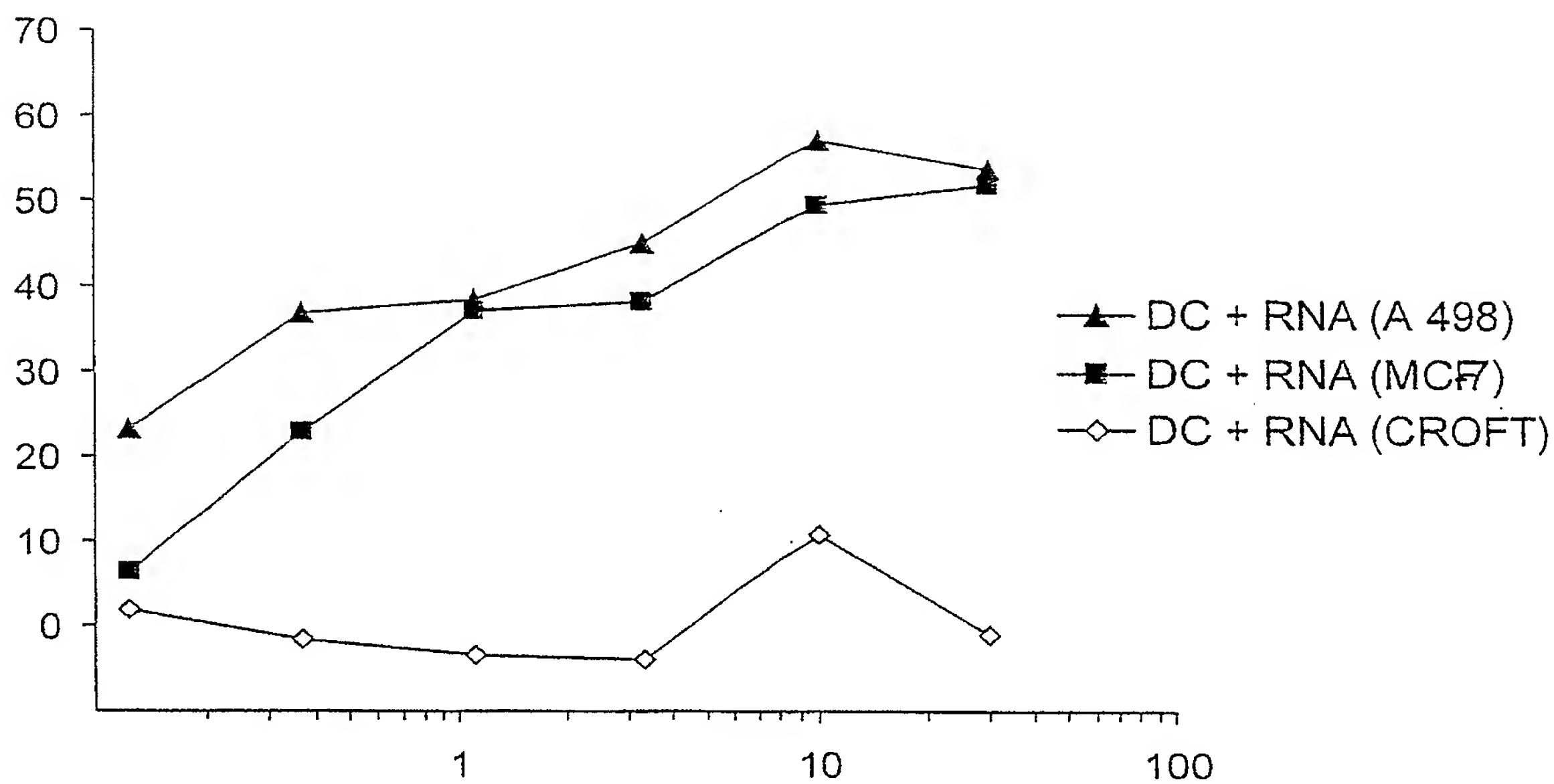


Fig. 5a

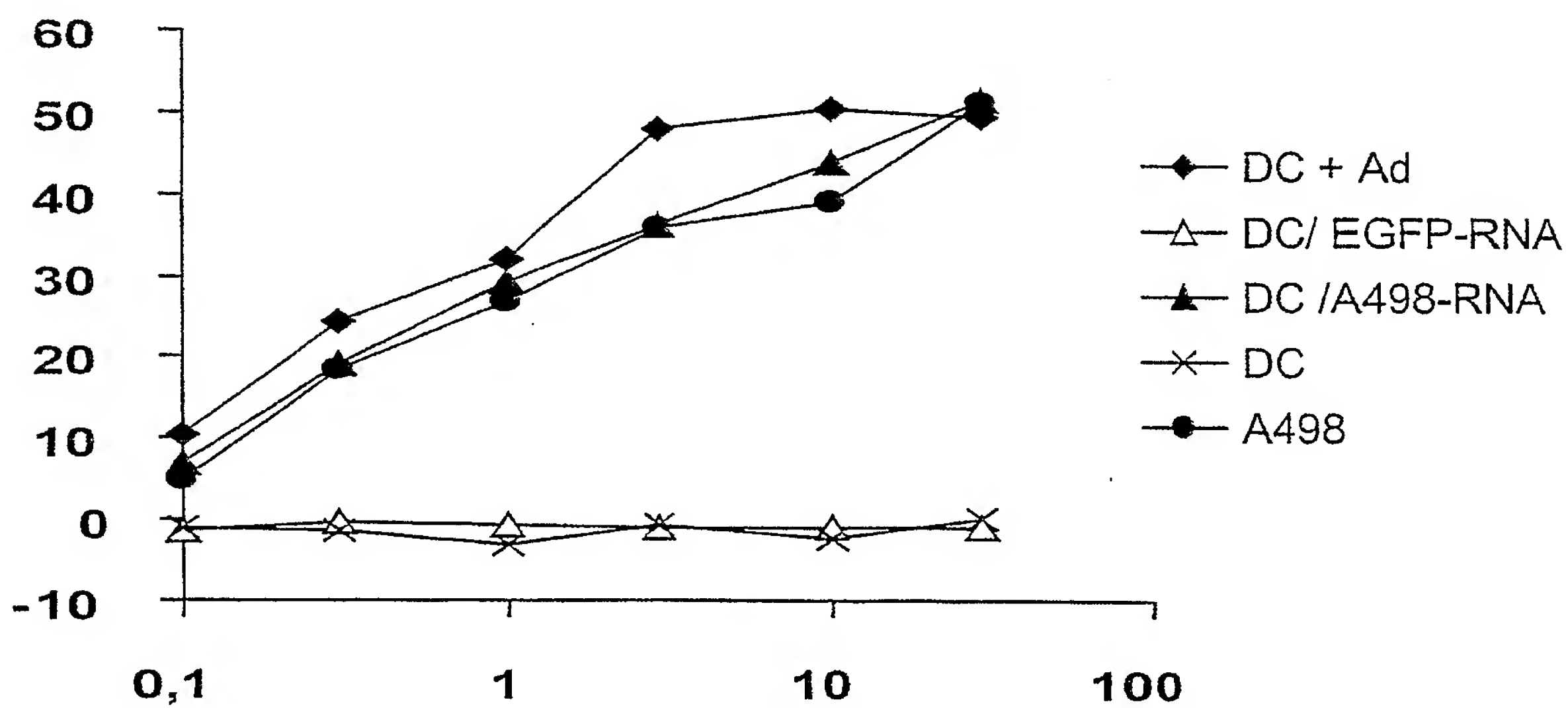


Fig. 5b

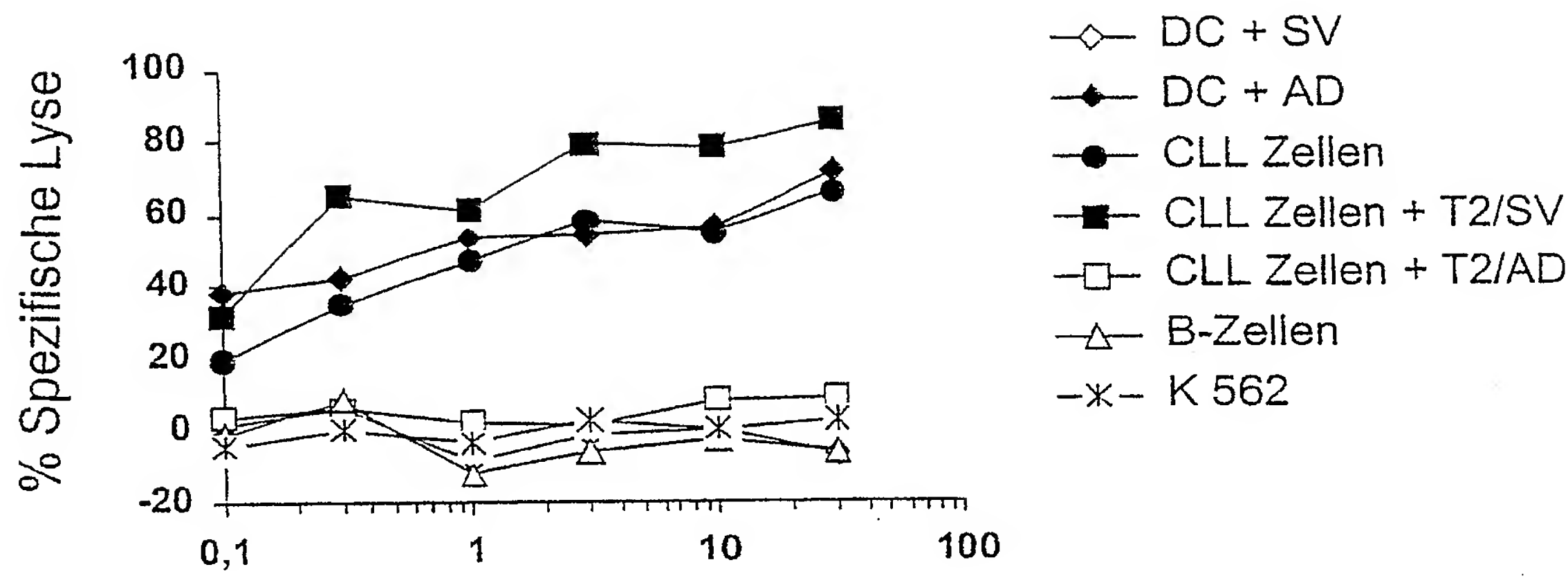


Fig. 6

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP03/03181

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC : C07K7/06 C07K16/00 C12N15/00 A61K38/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC : C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, SEQUENCE SEARCH, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 810 781 A (HOLLINSHEAD ARIEL C) 07 March 1989 (07.03.89) Example 1-4	1-17
A	----- SCHIRLE MARKUS ET AL: "Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach." EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 30, Nr. 8, August 2000 (2000-08), Pages 2216-2225, XP002246625 ISSN: 0014-2980 The whole document -----	1-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 July 2003 (07.07.03)

Date of mailing of the international search report

23 Octobre 2003 (23.10.03)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Friedrich, C

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## Information on patent family members

EP03/03181

Patent document  
cited in search report

Publication  
date

Patent family  
member(s)

Publication  
date

US 4810781

A

07-03-1989

NONE

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP03/03181

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
**See supplemental sheet additional matter PCT/ISA/210**
2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
**See supplemental sheet additional matter PCT/ISA/210**
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**See supplemental sheet**

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**1-17 in part**

### Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely

1. Claims: Invention 1: Claims 1-17 in part

tumor-associated peptide as per Seq. Id. No. 1 and its use.

2. Claims: Further Inventions: 2-79

each further tumor-associated peptide as per Seq. Id. No. 2-79 and its use represents a separate invention.

## Continuation of I.1

Although Claim 12 relates to a diagnostic method practiced on the human or animal body and Claims 7-10 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.

## Continuation of I.2

The current Claim 2 relates to a disproportionately large number of possible compounds. In fact it encompasses so many possible permutations that it appears so broadly worded that it is impossible to conduct a meaningful search. Therefore, the search was directed to the parts of the claims that can be considered concise, that is to Seq. Id. No. 1.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for

subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.



A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C07K7/06 C07K16/00 C12N15/00 A61K38/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, SEQUENCE SEARCH, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 4 810 781 A (HOLLINSHEAD ARIEL C) 7. März 1989 (1989-03-07) Beispiele 1-4	1-17
A	SCHIRLE MARKUS ET AL: "Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach." EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 30, Nr. 8, August 2000 (2000-08), Seiten 2216-2225, XP002246625 ISSN: 0014-2980 das ganze Dokument	1-17



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*&\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

2003

23.10.03

BNS page 73

der Internationalen Recherchenbehörde  
isches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
280 HV Rijswijk  
(+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
(+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Friedrich, C

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Patentzeichen

PCT/EP 03/03181

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
--	-------------------------------	-----------------------------------	-------------------------------

US 4810781      A      07-03-1989      KEINE

-----

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interr. ... es Aktenzeichen  
PCT/EP 03/03181

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. -  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☒ Ansprüche Nr. -  
weil sie sich auf Teile der Internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese Internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:  
1-17 in Teilen

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: Invention 1, Erfindung 1: Ansprüche 1-17 in Teilen

Tumorassoziiertes Peptid gemäss SEQ ID No.1 und dessen Verwendung.

---

2. Ansprüche: Inventions (further), Weitere Erfindungen: 2-79

Jedes weitere tumorassoziierte Peptid gemäss SEQ ID No.2-79 und dessen Verwendung stellt eine separate Erfindung dar.

---

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

## Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl der Anspruch 12 sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, und Ansprüche 7-10 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

## Fortsetzung von Feld I.2

Der geltende Patentanspruch 2 bezieht sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verbindungen. In der Tat umfasst erso viele mögliche Permutationen daß er im Sinne von Art. 6 PCT in einem solchen Maße weitläufig gefasst erscheinen, als daß er eine sinnvolle Recherche ermöglicht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, die als knapp gefaßt gelten können, nämlich die SEQ ID No.1.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.